

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**Departamento de Fisiología Animal II**



**TESIS DOCTORAL**

**Comparación celular y molecular de la bronquitis  
eosinofílica y el asma : papel de la vía de la prostaglandina  
E2 en la regulación de la hiperreactividad bronquial**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Beatriz Sara Sastre Turrión**

DIRECTOR:

**Victoria del, dir Pozo Abejón**

**Madrid, 2015**



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5327641228

T616.232/233  
22p  
conl

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA ANIMAL II**



**COMPARACIÓN CELULAR Y MOLECULAR DE LA  
BRONQUITIS EOSINOFÍLICA Y EL ASMA:  
PAPEL DE LA VÍA DE LA PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub> EN LA  
REGULACIÓN DE LA HIPERREACTIVIDAD BRONQUIAL**

**Beatriz Sara Sastre Turrión**

**Madrid, 2010**

626513869



139566286



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA ANIMAL II**

**COMPARACIÓN CELULAR Y MOLECULAR DE LA**  
**BRONQUITIS EOSINOFÍLICA Y EL ASMA:**  
**PAPEL DE LA VÍA DE LA PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub> EN LA**  
**REGULACIÓN DE LA HIPERREACTIVIDAD BRONQUIAL**

Memoria presentada por Beatriz Sara Sastre Turrión,  
Licenciada en Biología  
Para optar al título de Doctora

Directora de Tesis:  
Dra. M<sup>a</sup> Victoria del Pozo Abejón

Hospital Fundación Jiménez Díaz-Capio  
Departamento de Inmunología

Madrid, 2010



Este trabajo ha sido realizado en el Hospital Fundación Jiménez Díaz-Capio, en el Departamento de Inmunología, bajo la dirección de la Dra. M<sup>a</sup> Victoria del Pozo Abejón, con la ayuda de una beca de la Fundación Conchita Rábago y un contrato asociado a un proyecto del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), Instituto de Salud “Carlos III” del Ministerio de Ciencia e Innovación.



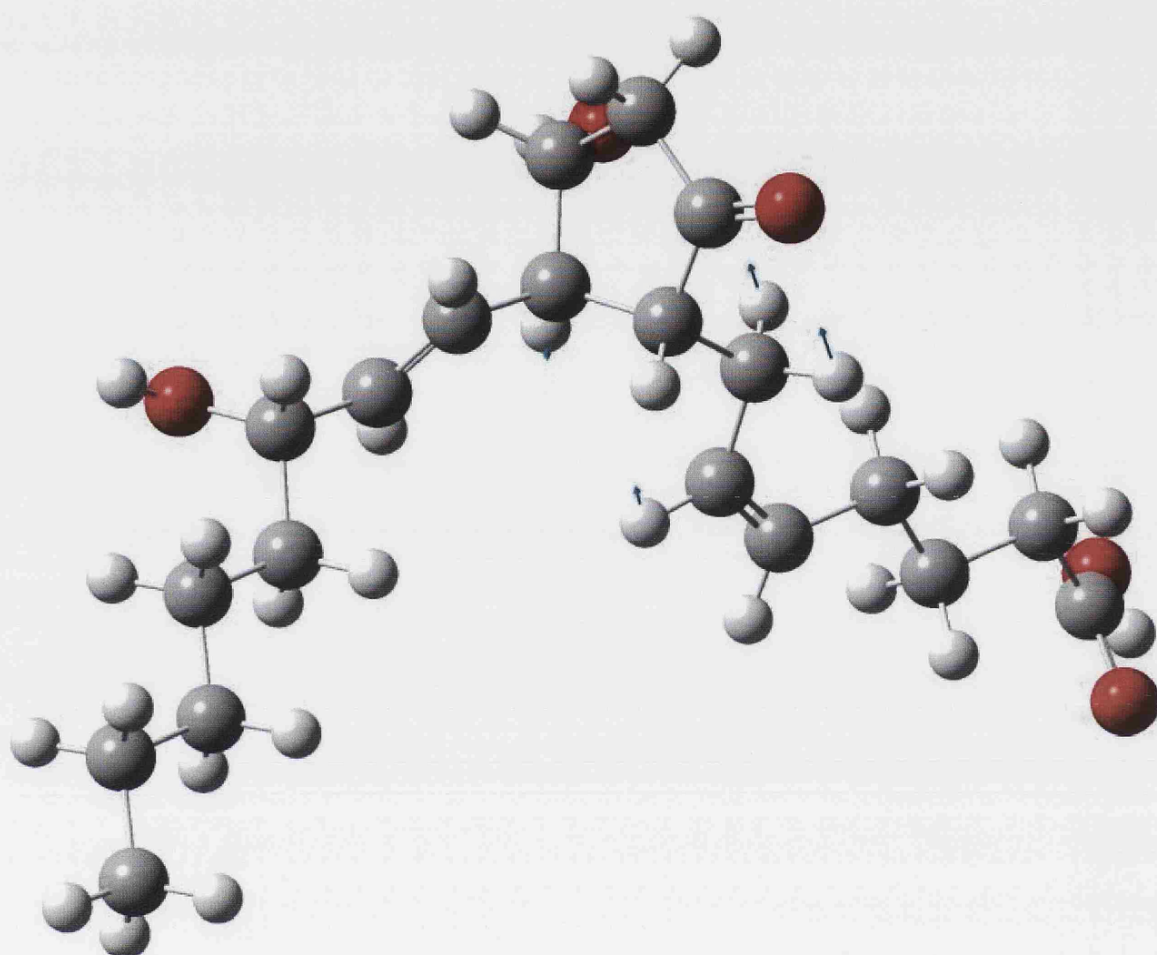
*La vida no se mide por el número de  
respiraciones que tomamos,  
sino por los momentos  
que nos dejan sin respiración*  
*Anónimo*



*A mis padres y hermanas,  
los principales pilares de apoyo en mi vida*







*Índice*



<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Asma</b>	<b>3</b>
<b>1.2. Bronquitis eosinofílica</b>	<b>5</b>
<b>1.3. Eosinófilos</b>	<b>13</b>
<b>1.4. Mediadores lipídicos: leucotrienos y prostaglandinas</b>	<b>18</b>
1.4.1. Cisteinil-leucotrienos (Cys-LTs)	18
1.4.2. Prostaglandinas	22
1.4.2.1. Ciclooxygenasas (COX)	23
1.4.2.2. Prostaglandinas sintasas (PGS)	24
1.4.3. Prostaglandina E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> )	24
1.4.3.1. Prostaglandina E sintasas (PGES)	25
1.4.3.2. Receptores de la PGE <sub>2</sub>	26
1.4.3.3. Efectos fisiológicos de la PGE <sub>2</sub>	27
1.4.3.4. PGE <sub>2</sub> y patologías inflamatorias pulmonares	28
<b>1.5. El proceso de remodelación y la musculatura lisa bronquial</b>	<b>31</b>
<b>1.6. Apoptosis</b>	<b>34</b>
<b>1.7. Métodos no invasivos en la evaluación de la inflamación de las vías aéreas</b>	<b>38</b>
1.7.1. Condensado de aire exhalado	38
1.7.2. Óxido nítrico exhalado	39
1.7.3. El esputo inducido	41
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>45</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>49</b>
<b>3.1. Sujetos de estudio</b>	<b>51</b>
3.1.1. Grupos de estudio	51
3.1.2. Determinación de la hiperrespuesta bronquial	52
<b>3.2. Esputo inducido</b>	<b>53</b>

3.2.1. Obtención de la muestra de esputo inducido	53
3.2.2. Procesamiento del esputo inducido	53
<b>3.3. Análisis de las subpoblaciones celulares en sangre periférica y en esputo inducido</b>	54
3.3.1. Preparación de la sangre periférica para citometría de flujo	54
3.3.2. Preparación del esputo inducido para citometría de flujo	56
<b>3.4. Purificación de eosinófilos de sangre periférica</b>	56
<b>3.5. Evaluación de la IgE total</b>	59
<b>3.6. Análisis de la expresión de citocinas en el foco inflamatorio (esputo inducido) por PCR Cuantitativa a Tiempo Real</b>	59
3.6.1. Extracción del ARN	59
3.6.2. Síntesis del ADN complementario (ADNc)	60
3.6.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) Cuantitativa a Tiempo Real (qRT-PCR)	60
<b>3.7. Análisis a nivel proteico de diversas citocinas, factores y mediadores lipídicos en el sobrenadante del esputo inducido</b>	62
<b>3.8. Análisis de la expresión génica de las enzimas implicadas en la ruta de biosíntesis de la PGE<sub>2</sub></b>	63
<b>3.9. Evaluación de los receptores de la PGE<sub>2</sub></b>	64
3.9.1. Evaluación génica de los receptores de la PGE <sub>2</sub>	64
3.9.2. Evaluación proteica de los receptores de la PGE <sub>2</sub>	65
3.9.2.1. Microscopía confocal	65
3.9.2.2. Citometría de flujo	66
<b>3.10. Evaluación de la apoptosis de eosinófilos de sangre periférica</b>	66
3.10.1. Efectos del sobrenadante del esputo inducido sobre la apoptosis de los eosinófilos de sangre periférica	69
3.10.2. Efectos de la PGE <sub>2</sub> y agonistas sintéticos sobre la apoptosis de los eosinófilos de sangre periférica	69
<b>3.11. Cultivos de células musculares lisas bronquiales (CMLB)</b>	70

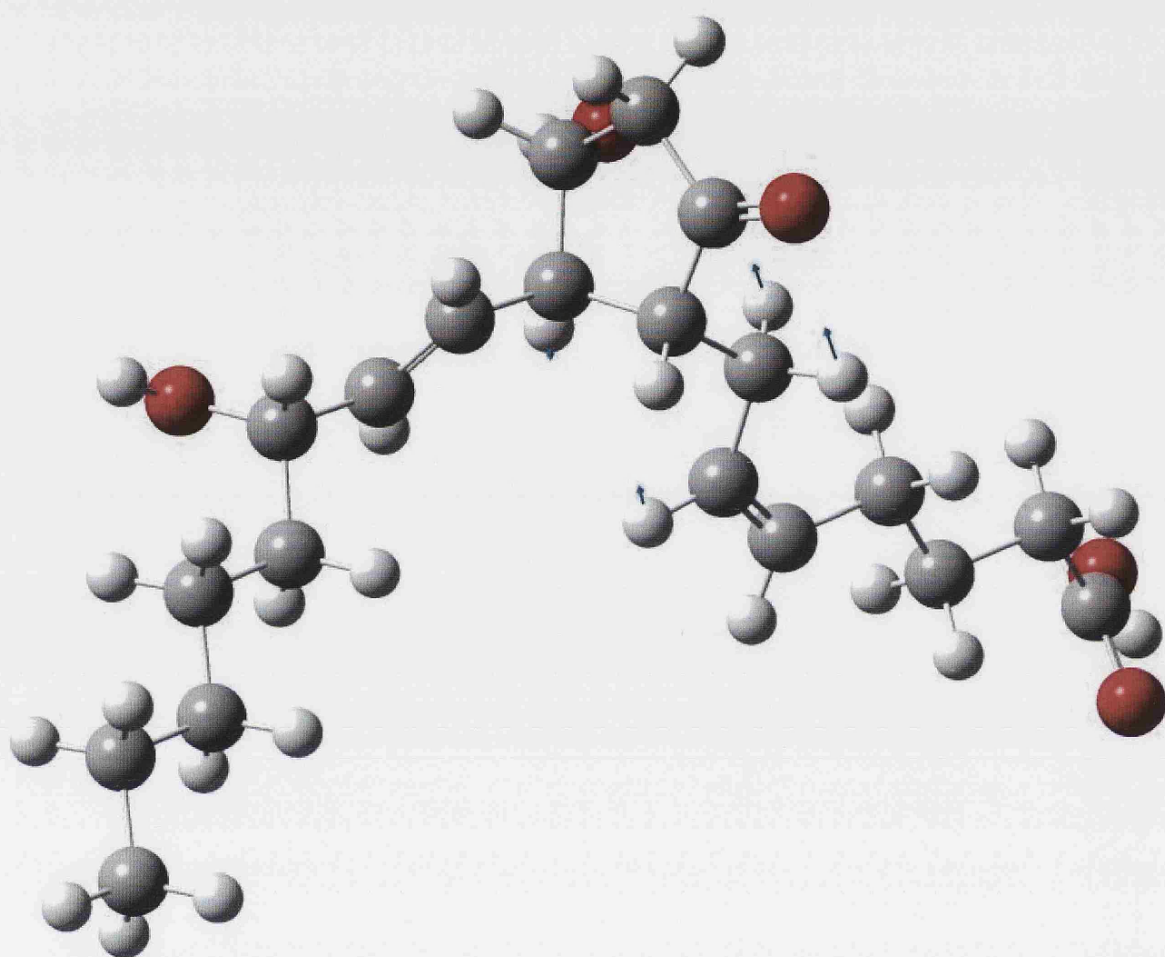
3.11.1. Proliferación de células musculares lisas bronquiales (CMLB) cultivadas con sobrenadante de esputo inducido	71
3.11.2. Acción de la PGE <sub>2</sub> sintética, agonistas y antagonistas de sus receptores sobre la proliferación de las células musculares lisas bronquiales (CMLB)	72
<b>3.12. Análisis estadístico</b>	73
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>75</b>
<b>4.1. Características clínicas de los pacientes del estudio</b>	77
<b>4.2. Patrón celular inflamatorio</b>	78
4.2.1. Análisis del patrón celular en sangre periférica	78
4.2.2. Análisis de la celularidad en el esputo inducido	80
<b>4.3. Patrón de producción de IgE</b>	83
<b>4.4. Análisis de la expresión génica de diversos factores y citocinas en el esputo inducido</b>	84
<b>4.5. Evaluación proteica de diversas citocinas y factores en el sobrenadante del esputo inducido</b>	86
<b>4.6. Evaluación de los niveles de los mediadores lipídicos en el sobrenadante del esputo inducido</b>	88
<b>4.7. Análisis de la expresión génica de las enzimas implicadas en la ruta de biosíntesis de la PGE<sub>2</sub></b>	90
4.7.1. Ruta enzimática de la PGE <sub>2</sub> en eosinófilos de sangre periférica	91
4.7.2. Ruta enzimática de la PGE <sub>2</sub> en esputo inducido	93
4.7.3. Ruta enzimática de la PGE <sub>2</sub> en biopsias bronquiales	94
<b>4.8. Evaluación de los receptores de la PGE<sub>2</sub></b>	96
4.8.1. Evaluación a nivel génico de los receptores de la PGE <sub>2</sub>	96
4.8.1.1. Eosinófilos de sangre periférica	96
4.8.1.2. Esputo inducido	98
4.8.1.3. Biopsias bronquiales	99
4.8.2. Expresión a nivel proteico de los receptores de la PGE <sub>2</sub>	100

4.8.2.1. Microscopía confocal	100
4.8.2.2. Citometría de flujo	101
<b>4.9. Actuación de la PGE<sub>2</sub> sobre la apoptosis eosinofílica</b>	<b>102</b>
4.9.1. Efectos del sobrenadante del esputo inducido sobre la apoptosis de eosinófilos purificados de sangre periférica	102
4.9.2. Efectos de la PGE <sub>2</sub> sintética y agonistas sobre la apoptosis de eosinófilos purificados de sangre periférica	103
<b>4.10. Evaluación de los efectos de la PGE<sub>2</sub> sobre la proliferación de las células musculares lisas bronquiales (CMLB)</b>	<b>105</b>
4.10.1. Inhibición de la proliferación de las CMLB: ensayos con los sobrenadantes del esputo inducido	105
4.10.2. Inhibición de la proliferación de las CMLB: ensayos con PGE <sub>2</sub> sintética, agonistas de EP2 y EP4 y antagonistas de EP1, EP2 y EP4.	106
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>109</b>
5.1. Elección del esputo inducido como muestra de estudio	112
5.2. IgE total: parte de la respuesta humoral	114
5.3. Diseño del estudio	115
5.4. Caracterización del patrón celular existente en esputo inducido y sangre periférica	116
5.5. Caracterización génica y proteica de citocinas en el esputo inducido	120
5.6. Mediadores lipídicos: su papel en el asma y la bronquitis eosinofílica	126
5.7. Niveles de expresión génica de los componentes enzimáticos de la ruta de la PGE <sub>2</sub> en eosinófilos de sangre periférica, esputo inducido y biopsias bronquiales	131
5.8. Estudio de los receptores de la PGE <sub>2</sub> : patrón de expresión en eosinófilos de sangre periférica, esputo inducido y biopsias	

bronquiales	137
5.9. Efectos ejercidos por la PGE <sub>2</sub> sintética y el sobrenadante del esputo inducido sobre la apoptosis eosinofílica	141
5.10. La PGE <sub>2</sub> como elemento regulador de la hiperplasia muscular	145
6. CONCLUSIONES	151
7. BIBLIOGRAFÍA	155
8. ANEXO I. ABREVIATURAS	183
9. ANEXO II. PUBLICACIONES	191
10. AGRADECIMIENTOS	229







## *1. Introducción*



## 1.1. ASMA

El asma, enfermedad inflamatoria crónica de las vías aéreas, es una patología de gran complejidad y carácter multifactorial de la que, aún habiendo sido descrita por primera vez en 1859 por Henry Hide Salter<sup>[1]</sup> como una patología concreta e independiente, todavía hoy, más de un siglo y medio después, se desconocen múltiples aspectos relacionados con su origen y evolución.

Ha sido en las tres últimas décadas (desde los años 70) cuando su prevalencia ha aumentado de manera espectacular, principalmente en los países occidentales y/o industrializados, constituyendo en éstos la enfermedad crónica más común en la infancia<sup>[2]</sup> y llegando a afectar entre un 7%<sup>[3]</sup> y un 20% de la población total<sup>[4]</sup>.

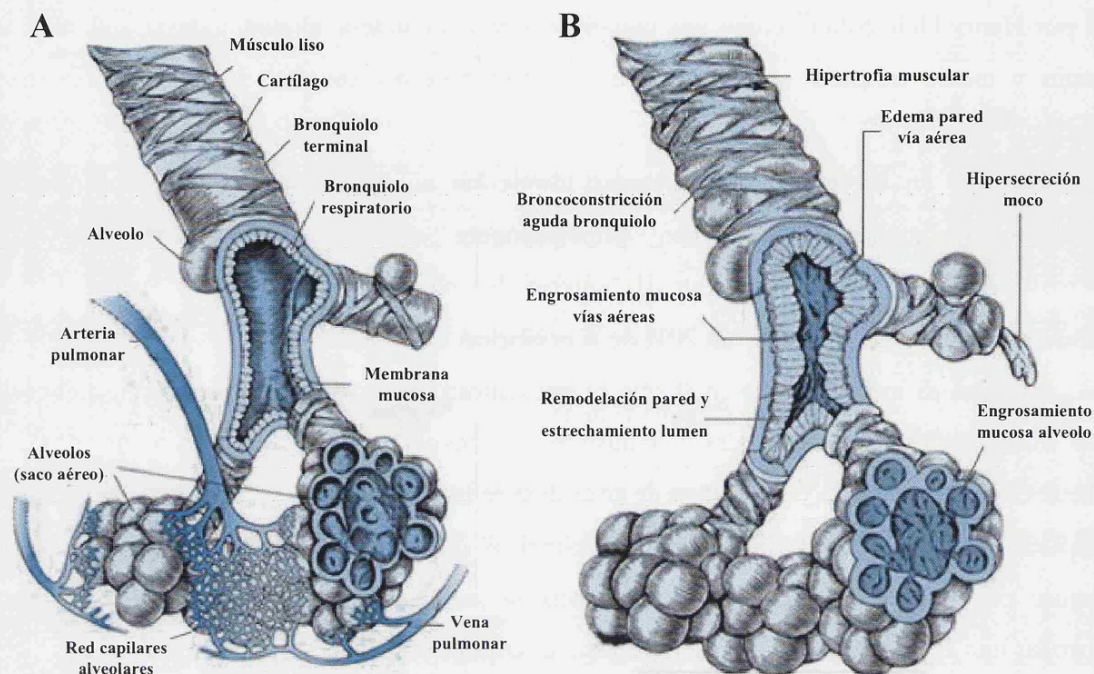
El asma es una patología en la que se encuentran implicados tanto factores genéticos<sup>[2]</sup> como nutricionales<sup>[5]</sup> y ambientales<sup>[6]</sup>; incluso se la vincula con el cambio climático<sup>[7]</sup> y los oxidantes exógenos y endógenos<sup>[8]</sup>. Han de considerarse las interacciones genes-ambiente, aunque la importancia de cada uno de estos dos parámetros difiere entre unos autores y otros. En cualquier caso, parece indiscutible la relevancia de la atopia (predisposición genética para desarrollar una respuesta mediada por IgE) que es considerada el principal factor de riesgo para la aparición de asma alérgica<sup>[9]</sup>, así como el papel que juega la carga genética<sup>[2]</sup>. Posiblemente los factores ambientales sean más importantes a la hora de determinar el que un paciente atópico desarrolle asma, mientras que los factores genéticos condicionan la gravedad de expresión del cuadro y la amplificación de la respuesta inflamatoria<sup>[10]</sup>.

Aunque en algunos casos su desarrollo y evolución no están claros, se considera una patología de base inmunológica que tiene lugar tras exposiciones ambientales a alérgenos (proteínas inocuas para la gran mayoría de la población), agentes infecciosos y sustancias contaminantes en pacientes con susceptibilidad genética<sup>[11,11]</sup>.

En cuanto a su patogenia, el asma es una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias caracterizada por una inflamación de predominio eosinofílico, hipersecreción de moco e hiperrespuesta bronquial (HRB). Además, presenta remodelación de la pared bronquial y obstrucción reversible (parcial o total) al flujo aéreo. La inflamación provoca episodios recurrentes de sibilancias, disnea, opresión torácica y tos (Figura 1).

El infiltrado inflamatorio existente, aunque clásicamente asociado a un dominio eosinofílico, está también constituido por neutrófilos, macrófagos, mastocitos y linfocitos T (mayoritariamente CD4<sup>+</sup>), desempeñando estos últimos un papel primordial en la fisiopatología del asma. Este infiltrado viene acompañado de la liberación de mediadores pro-inflamatorios,

mediadores citotóxicos, citocinas y quimiocinas que contribuyen al mantenimiento de la inflamación<sup>[12]</sup>.



**Figura 1. Alteraciones fisiológicas características de la patología asmática.** En esta doble imagen se representan los cambios que se producen en el asma a nivel de las vías aéreas inferiores. **A.** Un bronquio sano sin alteraciones. **B.** En los bronquios de los pacientes con asma se observan una serie de alteraciones importantes como son hipertrofia muscular, edema en la pared, engrosamiento de la mucosa a nivel de la vía aérea y alveolar, hipersecreción continua de moco y remodelación de la pared con el consiguiente estrechamiento del lumen.

El proceso fisiopatológico del asma alérgica se puede subdividir en dos etapas:

\* **FASE TEMPRANA.** Esta fase se inicia, de forma muy rápida, a los pocos minutos del contacto con el alérgeno. La entrada de dicho alérgeno desencadena un proceso de activación de aquellos subtipos celulares capaces de unir inmunoglobulina E (IgE) a su membrana, principalmente los mastocitos. Esta unión a la superficie celular desencadena, por parte de los mastocitos activados, la liberación de mediadores pro-inflamatorios como histamina, especies reactivas de oxígeno (ROS), etc. Todos estos factores participantes en la respuesta inflamatoria generan la contracción del músculo liso de las vías respiratorias, la secreción de moco, un aumento de la permeabilidad vascular así como una extravasación de plasma, lo que da como resultado la obstrucción de las vías respiratorias y, por tanto, una disminución del flujo aéreo.

\* **FASE TARDÍA.** 6-8 horas tras la exposición. En ella se produce un reclutamiento y activación de eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, basófilos y células T CD4<sup>+</sup> hacia las vías

aéreas, observándose la expresión de moléculas de adhesión y la liberación de mediadores pro-inflamatorios.

En esta fase, las células T CD4<sup>+</sup> juegan un papel fundamental<sup>[13]</sup>, así como en las distintas etapas de la patología asmática en general. Estos linfocitos se dividen en dos subtipos en función de las citocinas que liberan tras su activación: Th1 (interleucina (IL)-2, interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )) y Th2 (IL-5, IL-4 e IL-13), siendo este último subtipo el implicado en la respuesta asmática<sup>[14]</sup>. Aunque es innegable el papel crítico desarrollado por los linfocitos T, es la liberación de citocinas preformadas por parte de los mastocitos la que desencadena el reclutamiento inicial del componente celular inflamatorio, ya que no ha habido tiempo suficiente entre la fase temprana y la tardía para que se produzca la transcripción, traducción y producción de las citocinas en los linfocitos T activados. Por ello, se considera que las células T poseen una mayor implicación en fases más crónicas de la respuesta<sup>[15]</sup>.

Esta fase tardía se caracteriza a nivel clínico por la presencia de tos, sibilancias y disnea que constituyen un cuadro de bronconstricción aguda, el cual remite a los pocos días con la ayuda de tratamiento farmacológico o, en ocasiones, sin necesidad de él.

Actualmente, y de acuerdo con las guías sobre el manejo y prevención del asma, la clasificación de esta patología se realiza en función del control alcanzado con respecto a las manifestaciones de la enfermedad<sup>[16]</sup>, dividiéndose en tres categorías: controlada, parcialmente controlada y sin control. Sin embargo, las ediciones previas de estas guías subdividían dicha patología de acuerdo con la gravedad, basándose en la intensidad de los síntomas, la limitación del flujo de aire y la afectación de la función pulmonar, clasificándola en cuatro categorías: intermitente, leve persistente, moderada persistente y grave persistente.

## **1.2. BRONQUITIS EOSINOFÍLICA**

A finales de los años 80, P.G. Gibson y colaboradores describieron por primera vez un grupo de pacientes que presentaban tos crónica y una importante eosinofilia en esputo, pero sin las alteraciones funcionales características del asma, es decir, sin hiperreactividad bronquial y con pruebas funcionales pulmonares normales<sup>[17,18]</sup>. Lo denominaron bronquitis eosinofílica sin asma, o simplemente, bronquitis eosinofílica (BE). Así, en 1989, la bronquitis eosinofílica fue descrita como una entidad patológica propia o independiente.

La bronquitis eosinofílica suele aparecer en individuos de mediana edad, generalmente no fumadores. La presencia de atopía no suele ser más frecuente que en la población general, aunque

sí es menor que la encontrada en los pacientes con asma<sup>[19,20]</sup>. Cursa con tos persistente, poco o nada productiva, sin disnea ni sibilancias. Se caracteriza por la existencia de eosinofilia en esputo y los pacientes no presentan hiperreactividad bronquial a agentes farmacológicos (metacolina o histamina), teniendo pruebas de función pulmonar normales, aunque suelen tener una mayor sensibilidad del reflejo de la tos a capsaicina<sup>[21]</sup> existiendo, por tanto, claras diferencias con el asma en alguno de estos aspectos, los cuales se resumen en la Tabla I.

	<b>BRONQUITIS EOSINOFÍLICA</b>	<b>ASMA</b>
<b>Patogenia</b>	Desconocida	Atópica / No atópica
<b>Manifestaciones clínicas</b>	<b>Tos crónica aislada</b>	Disnea, tos, sibilancias
<b>Atopia</b>	Igual a población general	Frecuente
<b>Obstrucción variable al flujo aéreo</b>	<b>Ausente</b>	Presente
<b>Hiperrespuesta bronquial</b>	<b>Ausente</b>	Presente
<b>Eosinofilia en esputo</b>	<b>Siempre al diagnóstico</b>	Habitualmente
<b>Hipersensibilidad reflejo tos</b>	Aumentado	Normal o aumentado
<b>Infiltración eosinofílica en la biopsia bronquial</b>	Sí	Sí
<b>Eosinofilia en el LBA</b>	Sí	Sí
<b>Infiltración de los mastocitos en el músculo liso</b>	<b>Ausente o muy escasa</b>	Sí

**Tabla I. Características de asma y bronquitis eosinofílica.** Algunas de las principales características diferenciales y diagnósticas de la bronquitis eosinofílica aparecen en color azul (modificado de S. Quirce: Bronquitis eosinofílica. Asma. Volumen I: Ciencia básica y patogenia, 1ª edición, MRA Ediciones; 2004: 221-226<sup>[21]</sup>).

En contraste con el amplio conocimiento que existe actualmente sobre el asma, poco se conoce sobre la etiología y evolución natural de la bronquitis eosinofílica<sup>[22]</sup>.

Se considera que esta patología presenta una incidencia del 10-15% entre los pacientes que acuden al especialista<sup>[23,24]</sup> por tos crónica, siendo la rinitis con goteo nasal, la tos asmática y el reflujo gastroesofágico las causas más frecuentes de este síntoma<sup>[19,20]</sup> (Tabla II).

En cuanto a la etiología, la BE puede ser originada por la exposición a alérgenos comunes<sup>[25]</sup>, alérgenos ocupacionales<sup>[26]</sup>, así como por fármacos y, en ocasiones, por infecciones víricas<sup>[27]</sup>.

CAUSAS DE TOS CRÓNICA	INCIDENCIA
Goteo nasal posterior	8 -87%
Asma	20 – 30%
Reflujo gastroesofágico	10 – 21%
Bronquitis eosinofílica	13%
Bronquitis crónica y EPOC	5%
Bronquiectasias	4%
Carcinoma broncogénico	2%
Fármacos: IECA y otros	< 1%
Enfermedades intersticiales difusas pulmonares	< 1%
Post-infecciosa	< 1%
Tos psicógena	< 1%

**Tabla II. Causas de tos crónica.** En esta tabla se excluye el hábito tabáquico (modificado de Irwin et al. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141 (3): 640-647<sup>[28]</sup> y Poe et al. *Chest* 1989; 95: 723-728<sup>[29]</sup>).

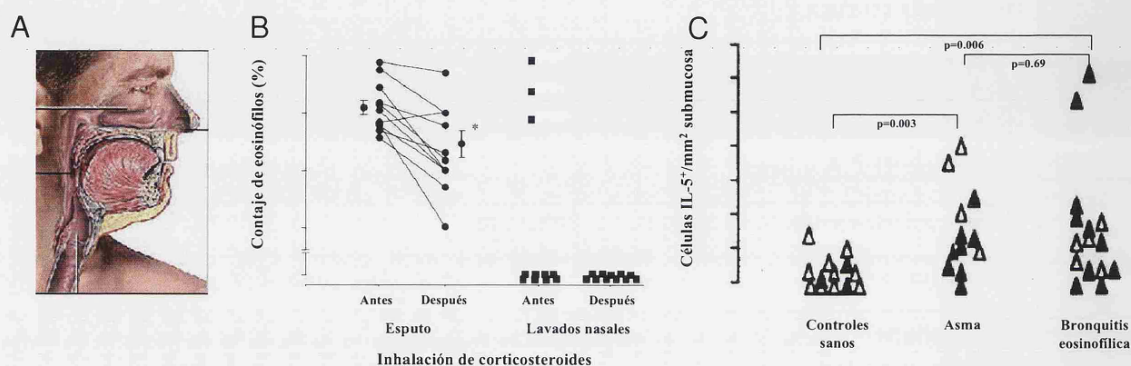
La tos es un mecanismo protector innato que garantiza la eliminación del moco, de sustancias nocivas e infecciones a lo largo de la vía respiratoria. Sin embargo, la presencia de tos persistente es indicativa de enfermedad, considerándose tos crónica aquella que persiste durante más de 3-8 semanas sin evidencias clínicas ni radiológicas de enfermedad pulmonar aguda<sup>[22]</sup>. La tos puede ser medida subjetivamente empleando una escala de gravedad y evaluación de la calidad de vida, u objetivamente, a través de la evaluación del número e intensidad de la tos mediante el análisis de la respuesta a capsaicina o ácido cítrico<sup>[30]</sup>.

La presencia de eosinofilia en el esputo es la segunda característica fundamental de la BE. Sin embargo, la existencia de dicha inflamación eosinofílica en este tipo de muestra no es una característica exclusiva de esta patología. La inflamación bronquial eosinofílica está presente en otras enfermedades respiratorias en las que, a diferencia de la BE, sí existe obstrucción al flujo aéreo. Gran parte de la investigación de los últimos años se ha centrado en intentar esclarecer la ausencia de hiperrespuesta de las vías respiratorias (HRVR) en los pacientes con BE, aún existiendo infiltrado eosinofílico. Así, se han planteado distintas hipótesis para intentar explicarlo.

Inicialmente se postuló que la inflamación eosinofílica estaba localizada preferentemente en las vías respiratorias superiores dado que los síntomas nasales eran comunes en esta patología (Figura 2.A); no obstante, no se observó un aumento de la inflamación eosinofílica relevante en



los lavados nasales ni hiperreactividad nasal a metacolina en un grupo de pacientes con BE, a pesar de que estos sujetos presentaban, por lo general, síntomas en las vías altas. Además, la existencia de eosinofilia en esputo indicaba una inflamación de las vías respiratorias inferiores<sup>[23]</sup>, lo que descartaba que la inflamación estuviera localizada exclusivamente en las vías superiores (Figura 2).



**Figura 2. Diferencias existentes entre la bronquitis eosinofílica y el asma.** Brightling y colaboradores observaron, en pacientes con BE, la presencia y ausencia de eosinófilos en esputo y lavados nasales, respectivamente (B; modificado de Brightling et al. *Eur Respir J* 2000; 15; 682-686<sup>[23]</sup>). Además, este mismo grupo constató la similitud existente de citocinas entre los pacientes de asma y BE (C; modificado de Brightling et al. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 899-905<sup>[31]</sup>). Figura 2C: los triángulos negros representan sujetos atópicos y los triángulos blancos a los sujetos no atópicos; \* $p < 0,05$ ).

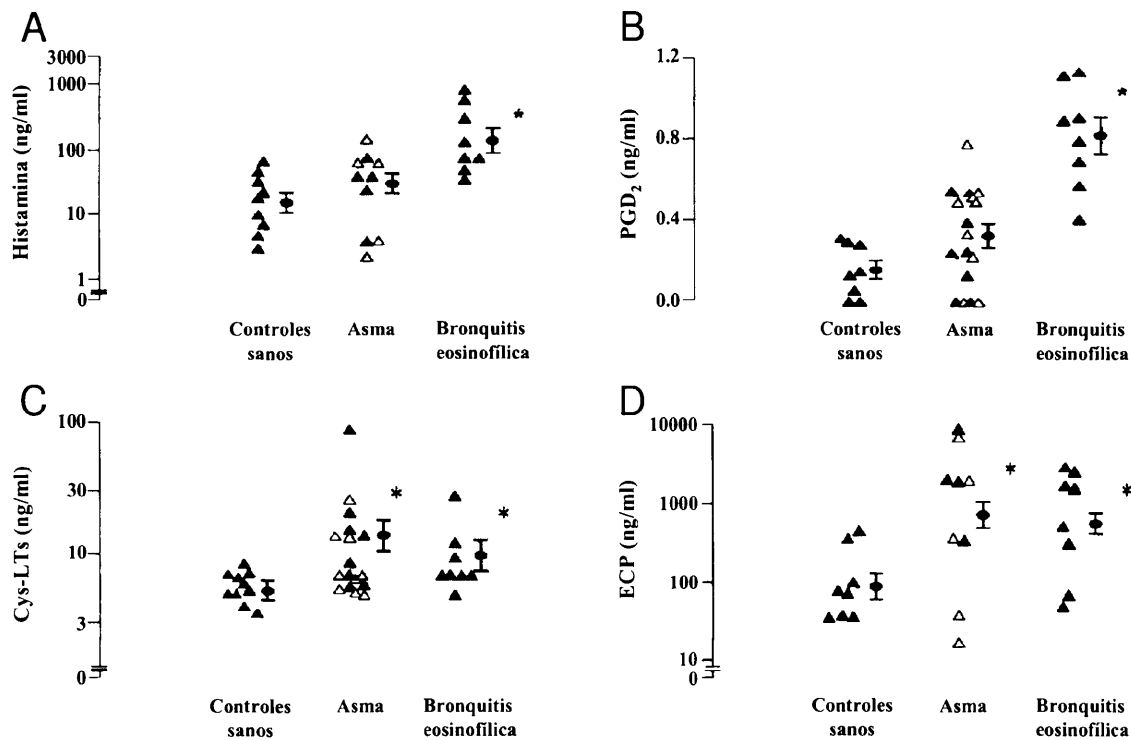
Además, el intento de vincular la ausencia de hiperreactividad bronquial a la localización de la inflamación en las vías superiores, no se sustenta por la similitud existente entre el patrón de citocinas Th2 expresadas en las vías aéreas de pacientes asmáticos y con BE (Figura 2.C)<sup>[31]</sup>. Esta similitud rompería la asociación entre citocinas Th2 (vinculadas a la inflamación eosinofílica) y las características distintivas del fenotipo asmático (ausentes en la bronquitis eosinofílica): la hiperreactividad bronquial y la obstrucción variable al flujo aéreo.

La segunda hipótesis que se planteó fue la posibilidad de que la inflamación de las vías aéreas en la BE fuera menos activa, con diferencias cualitativas o cuantitativas en los mediadores inflamatorios. Sin embargo, esta hipótesis se descartó debido a los resultados obtenidos por el grupo de Brightling y colaboradores<sup>[32]</sup> que demostraron la existencia de unos niveles más elevados de histamina y prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) en el sobrenadante del esputo de los pacientes con BE que en el de los pacientes asmáticos (Figura 3.A y 3.B).

Además, las concentraciones de cisteinil-leucotrienos (Cys-LTs) y proteína catiónica del eosinófilo (ECP) eran significativamente superiores en pacientes con BE y asma que en los

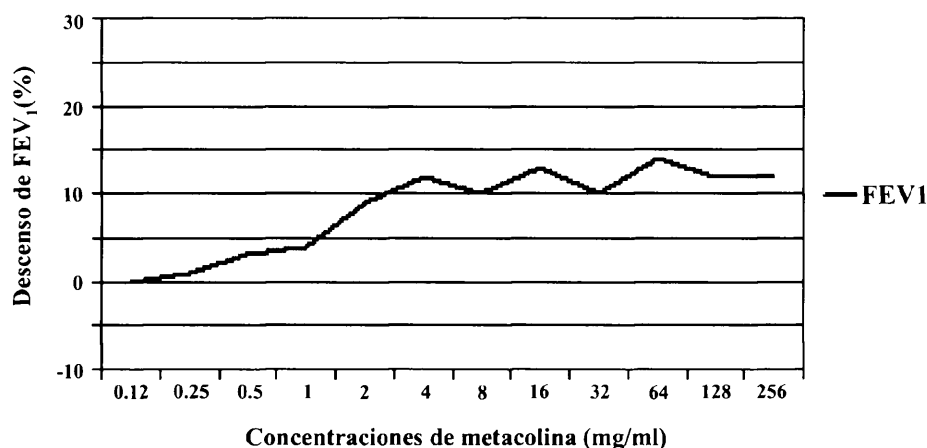


sujetos control, sin que existieran diferencias significativas entre los individuos pertenecientes a los grupos de enfermedad.



**Figura 3. Niveles de mediadores lipídicos e inflamatorios en el sobrenadante del esputo.** Los niveles de diversos mediadores inflamatorios observados por Brightling y colaboradores en pacientes con BE eran iguales o incluso superiores (histamina y PGD<sub>2</sub>) a los encontrados en individuos asmáticos (\* $p < 0,05$  vs controles; triángulos negros: tratados con corticosteroides, triángulos blancos; tratados sólo con  $\beta$ -agonistas; modificado de Brightling et al. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 878-882<sup>[32]</sup>).

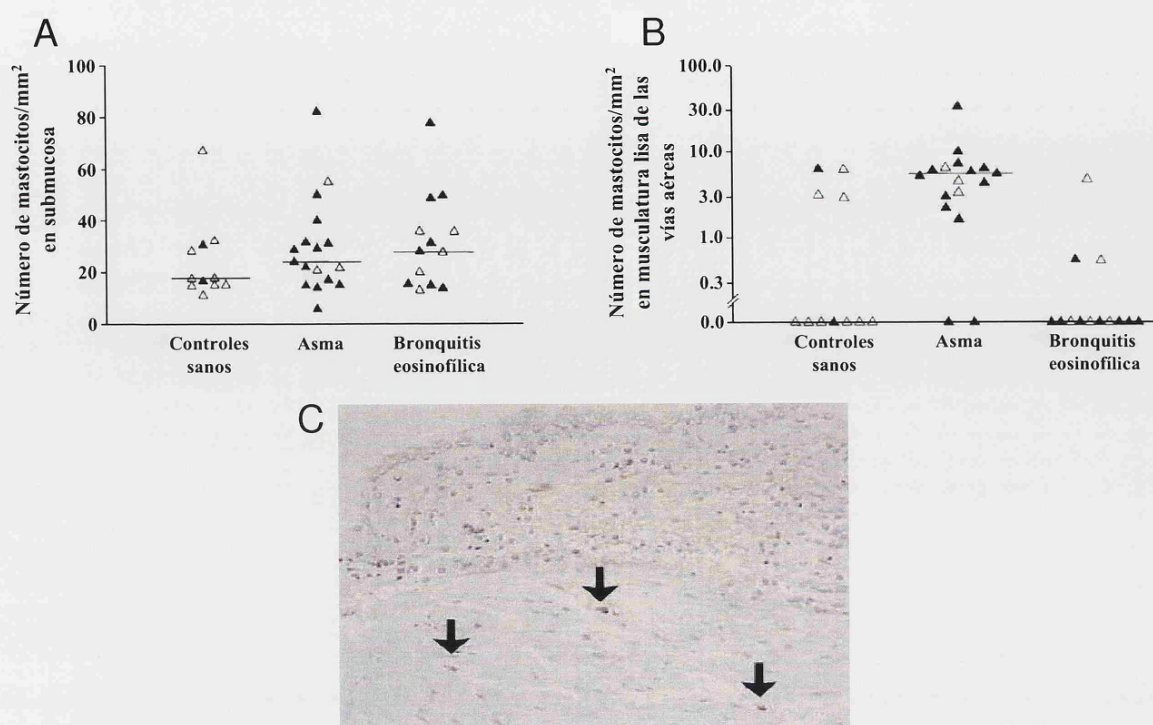
Otra teoría planteada fue que los pacientes con BE podrían tener cierto grado de hiperreactividad de las vías respiratorias (HRVR) o hiperreactividad bronquial (HRB), pero dentro del rango normal debido a que los valores basales de HRB en estos pacientes estarían muy desplazados hacia la derecha en la curva de dosis-respuesta<sup>[18]</sup>. Esta hipótesis se basa en el hecho de que en muchos pacientes se mejora el grado de obstrucción al flujo aéreo tras el tratamiento con corticosteroides inhalados (CI), permaneciendo siempre dentro del rango de la normalidad (Figura 4). Sin embargo, todos los pacientes con BE presentan valores dentro de la normalidad en los test de metacolina y monofosfato de adenosina (AMP). Incluso, en muchos casos, se observa una meseta en las curvas de dosis-respuesta, lo que claramente va en contra de una reactividad alterada.



**Figura 4. Curva de metacolina.** Representación del FEV<sub>1</sub> en una curva dosis-respuesta a metacolina (FEV<sub>1</sub>: volumen espiratorio forzado en el primer segundo).

Por otro lado, aunque los eosinófilos son característicos de esta patología, numerosos estudios han mostrado una igualdad en relación al porcentaje de este tipo celular entre asma y BE. Así, existe un importante componente de la HRB, independiente de esta inflamación eosinofílica, u otros aspectos funcionales de la respuesta inflamatoria que, aún estando vinculados con la inflamación eosinofílica de las vías respiratorias, pueden estar disociados de ella<sup>[33]</sup>.

Actualmente, los mastocitos han cobrado una gran importancia en las patologías respiratorias. En concreto, la localización de dicho tipo celular parece ser la clave para el desarrollo o no de HRB y de la obstrucción variable al flujo aéreo, marcando la diferencia entre asma y BE. La microlocalización celular constituye un principio de organización primordial en las respuestas inflamatorias. La presencia de mastocitos en la musculatura lisa de las vías respiratorias en pacientes asmáticos y su ausencia en BE, parece ser el factor clave en el desarrollo de obstrucción variable al flujo aéreo y, por tanto, una de las hipótesis más plausibles para explicar la ausencia de hiperreactividad en la BE (Figura 5). Así, mientras que en la patología asmática los mastocitos se encuentran infiltrando los haces de musculatura lisa (Figura 5.B y 5.C), en las biopsias de pacientes con BE se localizan en una zona más superficial, cercana al endotelio<sup>[34,35]</sup> (Figura 5.A), pareciendo existir una correlación, por un lado, entre infiltración en la musculatura lisa e hiperreactividad bronquial y, por otro, entre infiltración epitelial y bronquitis con tos<sup>[36]</sup>.



**Figura 5. Localización de los mastocitos en asma y bronquitis eosinofílica.** En el estudio de Brightling y colaboradores, los pacientes con BE presentaban un ligero incremento de mastocitos en la capa submucosa respecto a los pacientes con asma (A); sin embargo, en los pacientes asmáticos observaron un elevado número de mastocitos ubicados en la capa de la musculatura lisa de las vías aéreas (B). C. Fotografía en la que se observan mastocitos infiltrando la musculatura lisa (Brightling et al. *N Engl J Med* 2002; 346(22): 1699-1705<sup>[34]</sup>). Triángulos negros: individuos atópicos, triángulos blancos: individuos no atópicos.

Estos hallazgos indican que la interacción entre los mastocitos que se encuentran infiltrando el músculo liso de la vía aérea y las propias células musculares lisas bronquiales (CMLB), tendría un papel muy importante en la patogenia del asma (Figura 6).

En los pacientes asmáticos, esa proximidad existente entre el mastocito y las células de la musculatura lisa favorecería la contracción de ésta tras la degranulación de los mastocitos en respuesta a un estímulo específico, por ejemplo, un antagonista inhalado. Además, las citocinas liberadas por los mastocitos contribuirían al reclutamiento o atracción de más células inflamatorias a la vía aérea, incrementando así el estatus inflamatorio general de la zona (Figura 6).

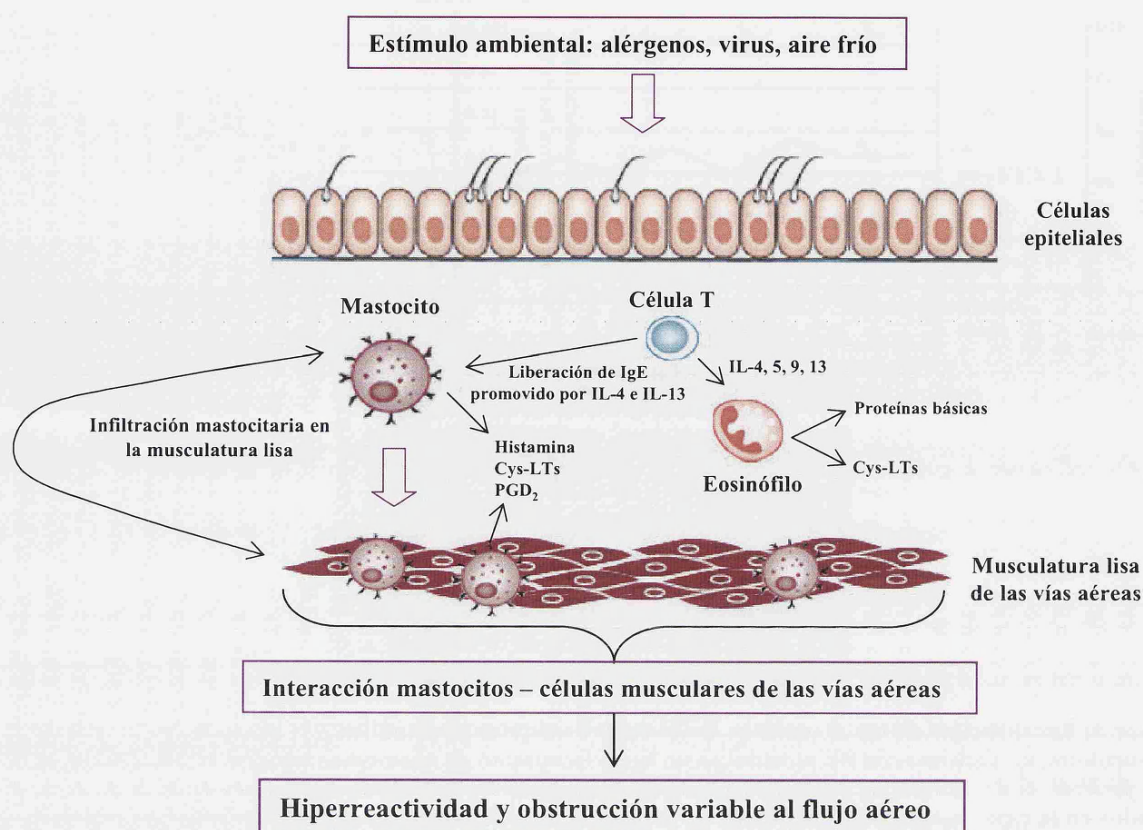
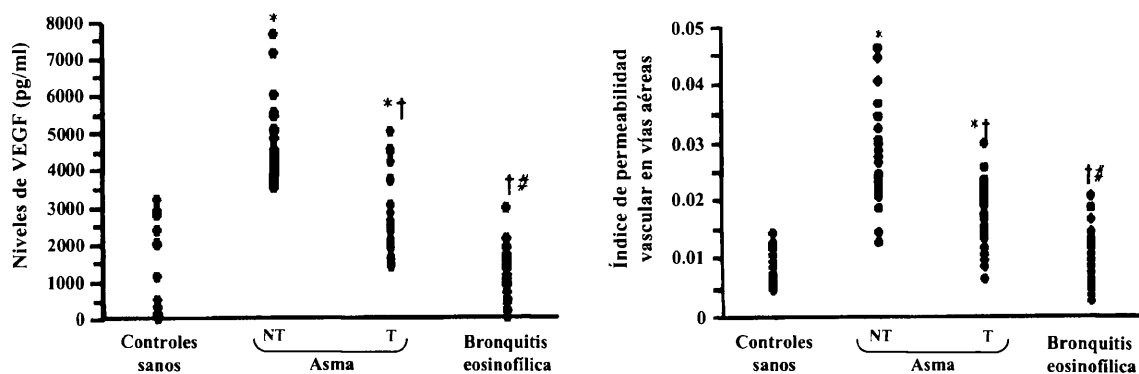


Figura 6. Esquema de la interacción entre los mastocitos y las células musculares de las vías aéreas. Numerosos factores actúan como desencadenantes del proceso de infiltración mastocitaria en la musculatura lisa: alérgenos, virus, aire frío. Esta migración de mastocitos se ve favorecida por la liberación de IgE promovida previamente por la IL-4 e IL-13 (modificado de Brightling et al. *Curr Allergy Asthma Rep* 2005; 5(2): 130-135<sup>[37]</sup>).

Otra hipótesis fue propuesta por Kanazawa y colaboradores<sup>[38]</sup>, en la que postularon que el aumento de la permeabilidad microvascular de las vías aéreas era debido al incremento en la producción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en el esputo de los pacientes asmáticos (y no en el de pacientes con BE), y que éste se correlacionaba de forma directa con el grado de hiperreactividad de las vías respiratorias (Figura 7). El aumento de la permeabilidad vascular en la vía aérea inducido por VEGF, con el consiguiente edema de la pared bronquial y estrechamiento del lumen, podría explicar por qué la HRB ocurre en el asma y no en la BE. Además, desvincularon este componente característico del asma de la existencia de eosinofilia. Sin embargo, otros trabajos han observado niveles de VEGF similares entre individuos asmáticos y sujetos sanos. En este sentido, Demoly y colaboradores<sup>[39]</sup> no encontraron dicha correlación entre los niveles de VEGF y el grado de extravasación plasmática en su estudio realizado con pacientes asmáticos crónicos estables, individuos con bronquitis crónica no tratada y sujetos control.



**Figura 7. Correlación entre los niveles de VEGF y el grado de hiperreactividad bronquial.** Kanazawa y colaboradores observaron en pacientes asmáticos elevados niveles de VEGF en el esputo inducido, así como un alto índice de permeabilidad vascular en las vías aéreas, ambos en comparación con los valores obtenidos en individuos con BE. (modificado de Kanazawa et al. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: 1125-1130<sup>[38]</sup>). NT: no tratados, T: tratados con dipropionato de beclometasona. \* $p < 0,01$  vs controles sanos, † $p < 0,01$  vs asmáticos NT, # $p < 0,01$  vs asmáticos tratados).

Aunque la BE no ha alcanzado la relevancia que tiene la patología asmática puesto que su sintomatología es más moderada y parece tener una evolución benigna y autolimitada<sup>[24]</sup>, el reconocimiento de estos pacientes es de gran importancia ya que responden bien al tratamiento con CI<sup>[40]</sup> (lo que además permitiría darles la mejor opción terapéutica posible). Tras el tratamiento con dicho tipo de fármacos, se observa una mejoría en las manifestaciones clínicas de la enfermedad, así como una reducción de la eosinofilia en esputo<sup>[21]</sup>. Por otro lado, el tratamiento con antitusígenos de acción central como la codeína y el dextrometorfano, mediante administración oral, parece ser efectivo en la supresión de la tos aguda y crónica<sup>[41]</sup>.

### 1.3. EOSINÓFILOS

Como se ha descrito previamente, el eosinófilo es uno de los componentes primordiales del infiltrado inflamatorio que caracteriza tanto al asma como a la bronquitis eosinofílica.

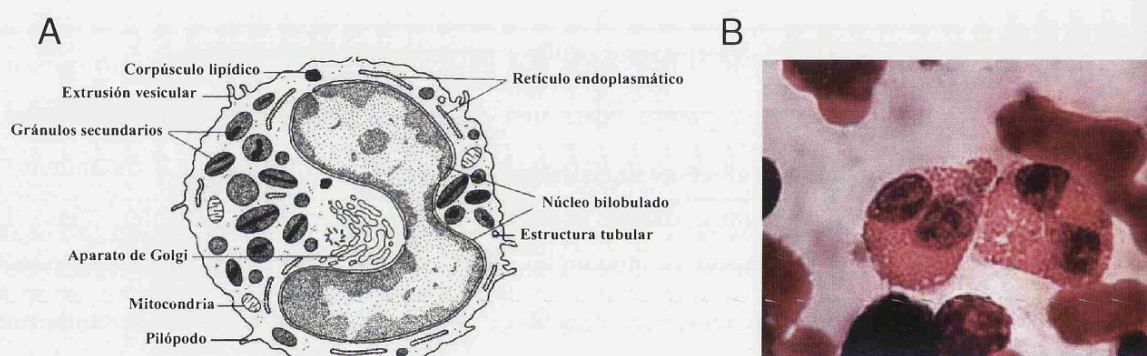
El eosinófilo fue descubierto y descrito por primera vez en 1879 por Paul Erlich, aunque no fue hasta 1922 cuando se describió su participación en procesos patogénicos<sup>[42]</sup>.

El eosinófilo es una célula de núcleo bilobulado, de aproximadamente 8  $\mu\text{m}$  de diámetro, sin capacidad proliferativa (los eosinófilos pueden permanecer en la circulación sanguínea entre 18h<sup>[43,44]</sup> y 25h<sup>[45]</sup>), procedente de médula ósea y caracterizado por poseer numerosos gránulos citoplasmáticos con un metabolismo muy activo (Figura 8). Estos gránulos se dividen en<sup>[43]</sup>:



- \* **Primarios.** Localizados en la membrana. Contienen fosfolipasa A y la proteína que forma los cristales de Charcot-Leyden característicos del esputo asmático. Constituye el 5-10% de la proteína eosinofílica.
- \* **Específicos o secundarios.** Adheridos a la membrana. Contienen principalmente cuatro proteínas catiónicas eosinofílicas básicas: proteína mayor básica (MBP), proteína catiónica del eosinófilo (ECP), neurotoxina derivada del eosinófilo (EDN) y peroxidasa del eosinófilo (EPO).
- \* **Pequeños.** Contienen arilsulfatasa B y fosfatasa ácida.

Los cristales de Charcot-Leyden y la MBP, junto con la ECP, son los principales marcadores de los eosinófilos<sup>[46]</sup>. Además, este subtipo celular, a partir de los fosfolípidos de membrana, también produce mediadores lipídicos como cisteinil-leucotrienos (Cys-LTs).



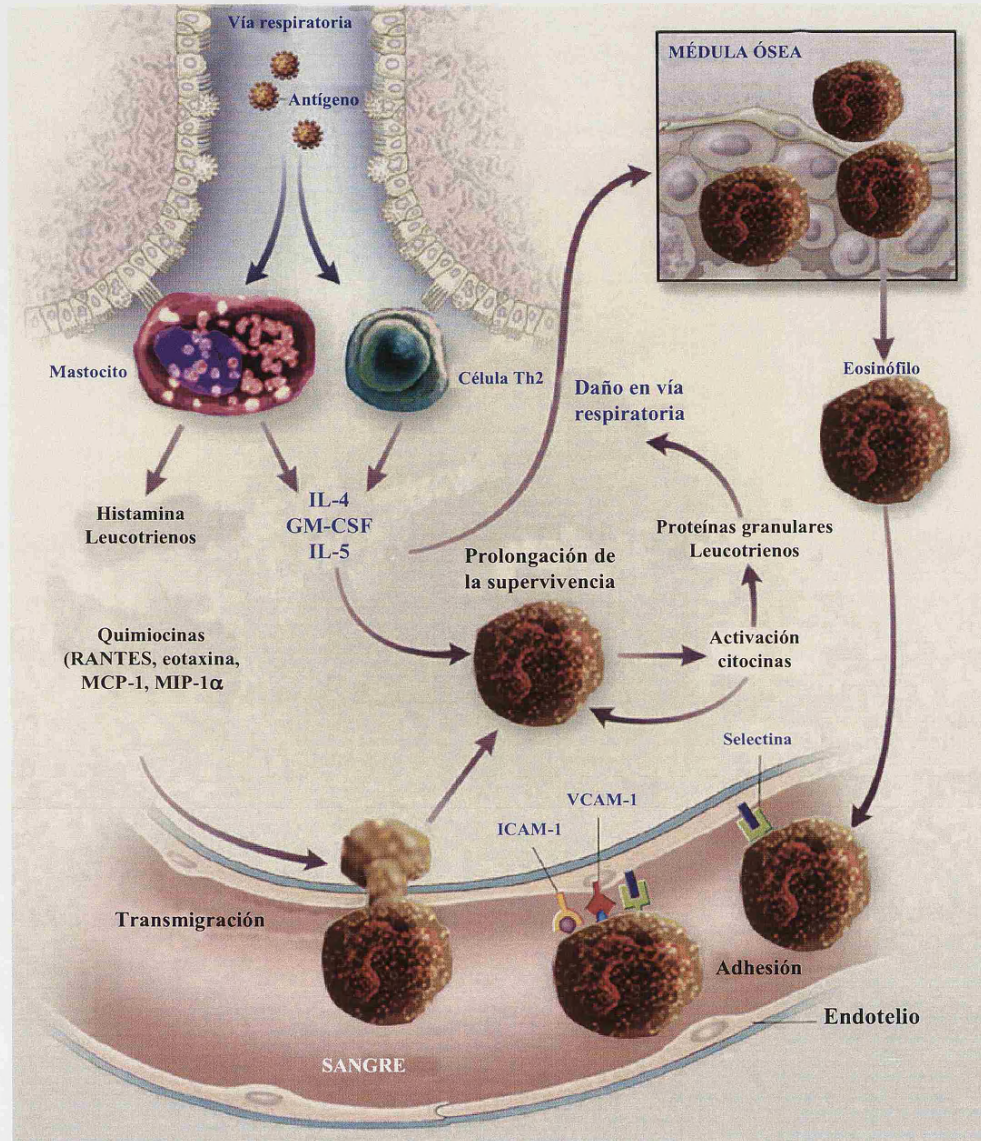
**Figura 8. Esquema y fotografía de microscopio electrónico de eosinófilo sanguíneo.** A. Este esquema refleja la gran complejidad a nivel citoplasmático del eosinófilo, el cual posee gran cantidad de gránulos. B. Frotis sanguíneo teñido con May-Grünwald Giemsa (objetivo de 1000 aumentos). Se observa claramente el característico núcleo bilobulado del eosinófilo (imagen disponible en [www.anatomohistologia.uns.edu.ar](http://www.anatomohistologia.uns.edu.ar)).

Clásicamente, los eosinófilos se han asociado con el mecanismo de defensa frente a infecciones helmínticas, estando también vinculados a enfermedades alérgicas como el asma y la dermatitis atópica<sup>[44]</sup>. En estas enfermedades alérgicas se produce un reclutamiento de eosinófilos hacia el foco inflamatorio desde la circulación sanguínea (Figura 9). Esa acumulación de eosinófilos en los tejidos se produce como resultado de cuatro fases:

**a. Diferenciación y proliferación en médula ósea.** Los eosinófilos se generan a partir de células pluripotenciales CD34<sup>+</sup>. En este proceso juegan un papel primordial tres citocinas: la interleucina-3 (IL-3), el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y la IL-5. Esta última es la más específica de los eosinófilos facilitando, además, su salida hacia el



torrente circulatorio desde la médula ósea<sup>[47]</sup>, siendo también importante la eotaxina para que tenga lugar este proceso de migración<sup>[48]</sup>.



**Figura 9. Esquema del proceso de inflamación alérgica y del papel desempeñado por el eosinófilo en dicha inflamación.** Los antígenos inhalados activan a los mastocitos y células Th2 de la vía aérea. Estas células, tras su activación, inducen la producción de mediadores inflamatorios y citocinas como IL-4 e IL-5. Esta última, en la médula ósea, promueve la diferenciación y maduración de los eosinófilos que salen a la circulación sanguínea a través de la cual llegan a la zona de inflamación, los pulmones, mediante procesos de adhesión (a través de la selectina) y *rolling* (por VCAM-1 e ICAM-1). En la supervivencia del eosinófilo en el tejido inflamado intervienen tanto la IL-5, como la IL-4 y el GM-CSF. Una vez allí, los eosinófilos activados liberan diversas citocinas así como proteínas granulares y leucotrienos, los cuales participan en el proceso de daño en la vía respiratoria asociado clásicamente al eosinófilo (modificado de Busse W *New England J Med* 2001; 344 (5): 350-362<sup>[49]</sup>).

**b. Adhesión, rodamiento (*rolling*) y migración.** Los eosinófilos establecen interacciones con las células endoteliales a través de las selectinas. Los eosinófilos expresan basalmente la L-selectina. Sin embargo, este proceso está mediado por la P-selectina. En el rodamiento y anclaje inicial, denominado *rolling*, se produce la activación de los receptores de las integrinas de los eosinófilos, aumentando la afinidad por sus ligandos y produciéndose una adhesión al endotelio mucho más firme<sup>[45]</sup>. Así, las principales moléculas de adhesión en los eosinófilos son CD11b/CD18 ( $\beta_2$ -integrinas) y VLA-4 ( $\beta_1$ -integrinas). Las  $\beta_2$ -integrinas interaccionan con las células endoteliales a través de la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y las  $\beta_1$ -integrinas con la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1). Esta última vía de adhesión es utilizada exclusivamente por los eosinófilos y las células mononucleares<sup>[42]</sup>. Existen también citocinas que promueven la expresión de las moléculas de adhesión en las células endoteliales: el interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) incrementa la expresión de ICAM-1 y la interleucina-4 (IL-4) aumenta la expresión de VCAM-1. De esta forma, la adhesión de los eosinófilos a las células endoteliales es promovida por la activación de ambos tipos celulares<sup>[45]</sup>.

**c. Diapédesis y quimiotaxis.** Existen numerosas moléculas que inician la migración de los eosinófilos a los tejidos. Entre ellas se encuentran mediadores lipídicos como el leucotrieno  $B_4$  (LTB<sub>4</sub>) y el factor de agregación plaquetaria (PAF), citocinas como IL-3, IL-5, IL-13, GM-CSF, IL-5 y RANTES, además de productos bacterianos. A su vez, existen unas quimiocinas, la eotaxina-1, 2 y 3, que se unen selectivamente al receptor CCR3.

**d. Activación y destrucción de los eosinófilos.** Los eosinófilos pueden sobrevivir en los tejidos durante largos períodos de tiempo (varias semanas) en función del microambiente de citocinas en el que se encuentren. Normalmente, son eliminados por muerte celular programada o apoptosis, aunque tienen capacidad para regular su propia supervivencia a través de una vía autocrina mediada por IL-5 y su receptor. Así, la permanencia tisular de este tipo celular dependerá de las señales pro y anti-apoptóticas presentes en dicho tejido<sup>[50]</sup>.

Los eosinófilos son un elemento primordial del infiltrado inflamatorio característico de las enfermedades respiratorias tales como el asma y la BE, siendo capaces de generar daño en la mucosa y en los nervios asociados a ella, mediante la liberación de<sup>[51]</sup>:

- Proteínas básicas asociadas a gránulos citoplasmáticos.
- Mediadores lipídicos.
- Especies reactivas de oxígeno.

los cuales se detallan en la Tabla III.



A través de las proteínas granulares, el eosinófilo puede dañar las células epiteliales y los nervios de las vías aéreas, alterando el batido ciliar y generando descamación epitelial; los mediadores lipídicos provocan broncoconstricción (BC) e hipersecreción de moco, mientras que las ROS provocan lesiones en las células mucosas<sup>[52]</sup>.

Proteínas básicas	F. fibrogénicos y de crecimiento	Quimiocinas	Citocinas	Otros
MBP	TGF- $\alpha$ , - $\beta$	Eotaxinas	IL-1,-2,-3,-4,-5,-6	Especies reactivas de O <sub>2</sub>
EPO	Angiogenina	RANTES	IL-9,-10,-11,-12	Neuropéptidos
EDN	FGF-2	MCP-1, -3, -4	IL-16,-17	MMP-9
ECP	HB-EGF	IL-8	IFN- $\gamma$	LTC <sub>4</sub>
	NGF	MIP-1 $\alpha$	GM-CSF	
	PDGF		TNF- $\alpha$	
	VEGF			
	SCF			

**Tabla III. Derivados inflamatorios producidos por el eosinófilo.** Los eosinófilos liberan gran cantidad de factores pro-inflamatorios, quimiocinas, citocinas, así como sus proteínas básicas preformadas y otros elementos (ROS, neuropéptidos...) en respuesta a un estímulo inflamatorio.

Los eosinófilos también podrían estar implicados en los procesos de reparación tisular y/o remodelación (*remodeling*) de las vías respiratorias ya que contienen citocinas preformadas pro-fibrogénicas como el factor transformador de crecimiento  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ), siendo el eosinófilo la principal fuente de síntesis de dicho factor. Además, se ha demostrado la correlación entre los niveles de TGF- $\beta 1$  con el número de fibroblastos y el engrosamiento de la capa subepitelial. Mediante este factor, los eosinófilos son capaces de incrementar la proliferación de los fibroblastos, células diana en la fibrosis tisular. Este papel modulador en la reparación y fibrosis lo ejercen, a su vez, a través de su interacción con los mastocitos, siendo esta interacción una de las vías que provocan la activación de distintas poblaciones celulares durante la fase tardía de la inflamación alérgica<sup>[53,54]</sup>.

Aunque los estudios iniciales en relación a los eosinófilos y las enfermedades respiratorias (en concreto el asma) asociaban los eosinófilos con la hiperreactividad bronquial, diversos trabajos demuestran que, posiblemente, los eosinófilos ejerzan un papel de mayor trascendencia

en la remodelación bronquial<sup>[3]</sup> característica de determinadas patologías respiratorias, que en la propia HRB<sup>[1,3]</sup>.

Por otro lado, el eosinófilo no sólo puede actuar como célula efectora sino también como célula accesoria presentadora de antígeno<sup>[42]</sup>, hecho corroborado en humanos mediante la demostración del papel de los eosinófilos endobronquiales en la presentación a los linfocitos T de alérgeno inhalado y la inducción de respuesta de tipo Th2<sup>[55,56]</sup>.

Dentro de la biología del eosinófilo, la IL-5 juega un papel primordial. Esta interleucina modula la liberación selectiva de este tipo celular desde la médula ósea, aumenta su adhesión a las células endoteliales, posee actividad quimiotáctica, incrementa la función efectora y prolonga la supervivencia de los eosinófilos al retrasar la muerte apoptótica<sup>[57]</sup>. Por todo ello, la IL-5 se perfilaba como una interesante molécula diana en el tratamiento de enfermedades que cursan con inflamación eosinofílica. A pesar de esto, se observó que el uso de terapias con anticuerpos (Acs) bloqueantes de IL-5 disminuía la eosinofilia de forma diferencial en función de la localización, aunque no se conseguía una eliminación completa de dicha eosinofilia. Además, no ejercía ningún efecto sobre la HRB. Sin embargo, el bloqueo de la IL-5 sigue considerándose un elemento importante, ya que son claros los efectos que dicha interleucina ejerce a lo largo de todo el mecanismo y papel fisiopatológico del eosinófilo en el asma y la bronquitis eosinofílica.

Por otro lado, existen otros mecanismos alternativos de regulación capaces de generar la existencia de niveles basales de eosinófilos y provocar la acumulación de este tipo celular en las zonas de inflamación alérgica. IL-4 e IL-13 juegan un papel importante, habiéndose vinculado ambas citocinas con la regulación de los eosinófilos en los tejidos, así como el tándem eotaxina/IL-5 con la regulación de los eosinófilos circulantes<sup>[58]</sup>.

## **1.4. MEDIADORES LIPÍDICOS: LEUCOTRIENOS Y PROSTAGLANDINAS**

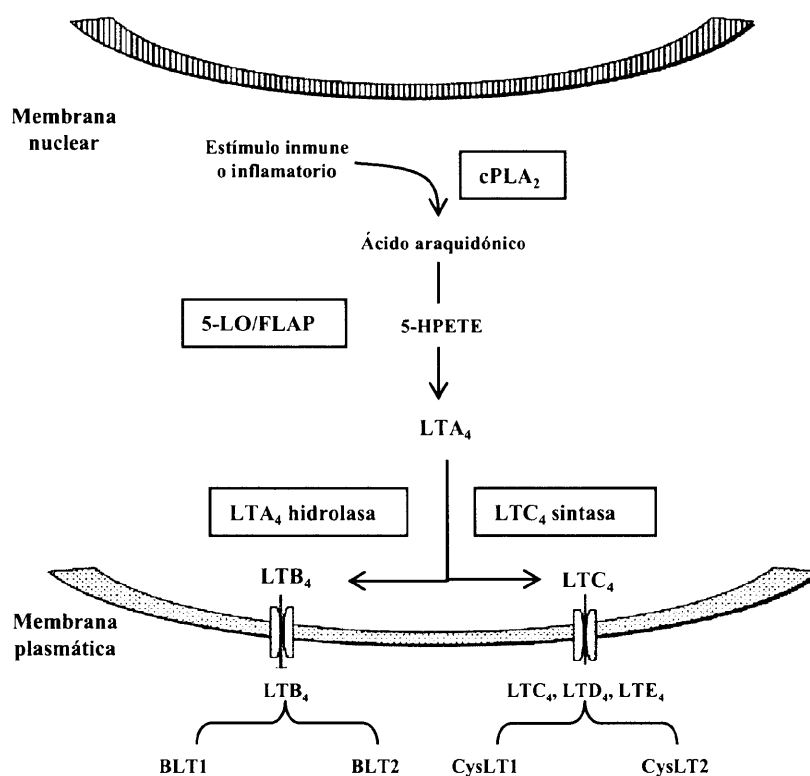
Dentro de los mediadores lipídicos implicados en la patogenia de la inflamación alérgica, podemos destacar los leucotrienos y las prostaglandinas.

### **1.4.1. Cisteinil-leucotrienos (Cys-LTs)**

A finales de los años 30 y principios de los años 40, se identificó una sustancia en el veneno de cobra con capacidad para contraer la musculatura lisa, siendo más tarde denominada

*slow-reacting substance of anaphylaxis*” (SRS-A)<sup>[59]</sup>. Fue a finales de los años 70 cuando se identificaron los componentes activos de dicha sustancia, definiéndose también su vía metabólica: los cisteinil-leucotrienos (Cys-LTs)<sup>[60]</sup>, introduciéndose en el año 1979 el término eicosanoide<sup>[61]</sup>.

Los leucotrienos (LTs) son eicosanoides producidos *de novo* a partir del ácido araquidónico (AA), el cual procede de la metabolización de los fosfolípidos de membrana por parte de la fosfolipasa A<sub>2</sub> citosólica (cPLA<sub>2</sub>) o por la fosfolipasa A<sub>2</sub> secretada (sPLA<sub>2</sub>). La enzima que transforma el AA en leucotrieno A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>) es la 5-lipooxigenasa (5-LO)<sup>[62]</sup>. La activación de la 5-LO se produce en respuesta a importantes agonistas como antígenos, anafilatoxinas del complemento (CP), exposición al factor de agregación plaquetaria (PAF)<sup>[59]</sup>, citocinas, activación celular con movilización de Ca<sup>2+</sup>, agentes microbianos o cambios de osmolaridad<sup>[63]</sup>. Así, en conjunción con la proteína activadora de 5-LO unida a membrana (FLAP), la 5-LO transforma el AA en LTA<sub>4</sub> a partir del cual se genera el LTB<sub>4</sub>, mediante la LTA<sub>4</sub> hidrolasa o, mediante la LTC<sub>4</sub>-sintasa (LTC<sub>4</sub>-S), los Cys-LTs: LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub>, siendo modulado el tándem 5-LO/LTC<sub>4</sub>-S por citocinas exógenas<sup>[64]</sup> (Figura 10).



**Figura 10. Biosíntesis de los leucotrienos.** A partir de la liberación del ácido araquidónico mediante diversas fosfolipasas que pueden ser citosólicas o secretadas, y a través de la 5-lipooxigenasa (5-LO) en conjunción con FLAP, se inicia la biosíntesis de los leucotrienos. En este grupo se encuentran englobados los Cys-LTs: LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub>. Sus principales receptores son el CysLT1 y el CysLT2 (modificado de Capra et al. *Curr Med Chem* 2006; 13: 3213-3226<sup>[65]</sup>). BLT1 y BLT2 son los receptores para LTB<sub>4</sub>.

Los Cys-LTs actúan principalmente a través de dos receptores situados en la parte externa de la membrana plasmática de células estructurales e inflamatorias: CysLT1 y CysLT2. Ambos receptores pertenecen a la familia de la rodopsina, integrada en la superfamilia génica de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Dichos receptores poseen 7 dominios transmembranales. Al igual que el resto de los receptores para los leucotrienos, CysLT1 y CysLT2 son capaces de activar dos clases de proteínas G: proteínas G de clase Gq, lo que provocaría el incremento del calcio intracelular, o las proteínas G de clase Gi, provocando una disminución de los niveles de AMP cíclico (AMPc) intracelular, o ambos efectos. Dichos procesos activarán diversas rutas de proteínas kinasas (PKs), culminando con múltiples respuestas celulares y tisulares<sup>[66]</sup>. Clásicamente, el CysLT1 es sensible a los antagonistas clásicos, mientras que CysLT2 media los efectos no inhibidos por los antagonistas clásicos<sup>[61]</sup>.

### A. CysLT1

El CysLT1 tiene un peso de 38 kDa presentando una elevada homología con el receptor del PAF. Posee sitios de unión para la proteína kinasa A (PKA). El metabolito que presenta una mayor afinidad por CysLT1 es el LTD<sub>4</sub>. El proceso de internalización inducido por agonistas es dependiente, de forma significativa, de la proteína kinasa C (PKC)<sup>[67]</sup>.

Se encuentra distribuido de forma muy amplia: bazo, intestino, placenta<sup>[68]</sup>, células musculares lisas del árbol bronquial, células epiteliales, mastocitos, monocitos, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, linfocitos B e, incluso, en pre-granulocitos CD34<sup>+</sup>.

Clásicamente se le asocia con:

- Incremento de la hiperreactividad de las vías aéreas.
- Aumento de la eosinofilia a través de la promoción de la supervivencia y funciones efectoras de los eosinófilos.
- Broncoconstricción (BC).
- Secreción de moco.
- Edema.

### B. CysLT2

Tiene un peso de 58 kDa. El LTD<sub>4</sub> y el LTC<sub>4</sub> poseen la misma afinidad por él. Se distribuye principalmente a nivel tisular, en corazón, cerebro, glándula y médula adrenal, bazo, nódulos linfoides y en leucocitos, mayoritariamente en eosinófilos pero también en mastocitos, macrófagos y basófilos. Se le asocia principalmente con procesos inflamatorios, de permeabilidad vascular y fibrosis tisular<sup>[66]</sup>.

Los Cys-LTs median diversos procesos de gran importancia en el mecanismo inflamatorio característico de determinadas patologías respiratorias como son el asma y la BE. Así, las principales funciones desarrolladas por estos eicosanoides en enfermedades como el asma son<sup>[69,65]</sup>:

- Broncoconstricción.
- Extravasación plasmática (edema).
- Quimiotaxis y quimiocinesis.
- Proliferación de las células musculares lisas (CML).
- Incremento del número y supervivencia de los eosinófilos.
- Disminución de la motilidad ciliar respiratoria, obstaculizando el aclaramiento mucociliar<sup>[62]</sup>.
- Inducción de HRB.
- Hipersecreción de moco.
- Activación de células inflamatorias.
- Contracción de la musculatura vascular.
- Aumento de la eosinofilopoyesis en médula ósea.

Debido a la importante implicación de los Cys-LTs en el asma, existen diversas aproximaciones terapéuticas cuya molécula diana forma parte de la vía de producción de estos eicosanoides:

**a. Antagonistas de los receptores de LTs (LTRAs).** Se introdujeron a finales de 1990, siendo la primera terapia innovadora tras la implantación de los corticosteroides inhalados (CI) en 1972. La segunda generación de estos fármacos es la más eficaz (Ej. Montelukast, Zafirlukast).

Los LTRAs bloquean la broncoconstricción (BC) mediada por los Cys-LTs, inhiben la inflamación bronquial y el reclutamiento de los eosinófilos al pulmón, disminuyen la secreción mucosa y el óxido nítrico exhalado (eNO), además de prevenir la remodelación de las vías respiratorias mediante la inhibición de la proliferación de las células musculares lisas<sup>[59,65]</sup>. También frenan la hiperplasia de células productoras de moco (células goblet), evitan el depósito de colágeno, la fibrosis y la liberación de citocinas Th2 en el pulmón<sup>[70]</sup>.

El uso de estos agentes aporta efectos significativamente beneficiosos a pacientes asmáticos con intolerancia a aspirina, rinitis alérgica y broncoconstricción inducida por ejercicio (BIE), estando recomendado en aquellos casos en los que el paciente no está bien controlado con CI<sup>[66]</sup>; disminuyen la severidad de la sintomatología y reducen el requerimiento de medicación de rescate. Aunque en Europa los LTRAs son considerados fármacos de tercera línea de

tratamiento<sup>[65]</sup>, son una importante opción terapéutica a largo plazo para complementar el control de la inflamación en niños y adultos con diversos fenotipos asmáticos. Además, siguiendo las recomendaciones de la guía GINA<sup>[16]</sup>, se pueden prescribir como tratamiento de primera línea (sin CI) en casos de asma leve intermitente.

**b. Inhibidores de 5-LO y FLAP.** Con este tipo de fármacos se bloquea la vía sintética de los Cys-LTs, inhibiendo la liberación de moco y la infiltración eosinofílica<sup>[71]</sup>. Sin embargo, el inhibidor de 5-LO existente en el mercado presenta importantes efectos secundarios a nivel de toxicidad hepática<sup>[66]</sup>.

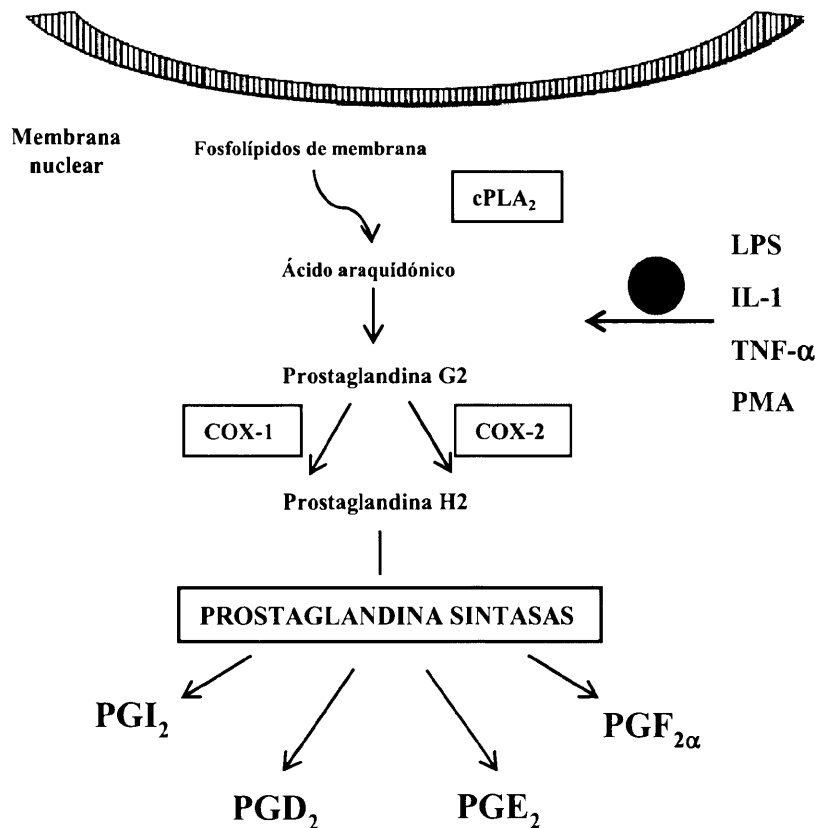
### 1.4.2. Prostaglandinas

A principios de los años 30, Goldblatt y Von Euler<sup>[72]</sup>, de forma independiente, determinaron la presencia de un ácido graso en el líquido seminal que poseía importantes propiedades vasoactivas, denominándolo prostaglandina.

En 1960, Bergstrom y Samuelsson describieron la estructura de las dos primeras prostaglandinas (PGs), PGE y PGF<sup>[73]</sup>. Finalmente Orloff, en 1965, elucidó por completo la estructura de las PGs y demostró que son un producto derivado del ácido araquidónico metabolizado por la vía de la ciclooxigenasa (COX).

Las prostaglandinas son pequeñas moléculas lipídicas derivadas del ácido araquidónico, producidas por muchos tipos celulares y que regulan numerosos procesos orgánicos entre los que se incluyen la función renal, la agregación plaquetaria, la liberación de neurotransmisores y la modulación de la función inmune<sup>[74]</sup>.

El primer paso en la formación de las prostaglandinas (común también a la generación de leucotrienos por la 5-LO) es la oxidación y la isomerización del ácido araquidónico (AA) a partir de los fosfolípidos de membrana mediante una fosfolipasa, usualmente la fosfolipasa A<sub>2</sub> citosólica (cPLA<sub>2</sub>), que requiere para su activación la presencia de Ca<sup>2+</sup> y la acción de la calmodulina. Este AA es metabolizado a PGG<sub>2</sub> y posteriormente a PGH<sub>2</sub> por la ciclooxigenasa-1 (COX-1) o la ciclooxigenasa-2 (COX-2). Esta molécula (PGH<sub>2</sub>), dada su gran inestabilidad, es transformada en diferentes prostaglandinas biológicamente activas, mediante las correspondientes prostaglandina sintasas, las cuales poseen diferentes estructuras, así como patrones específicos de expresión tisular y celular<sup>[75]</sup> (Figura 11).



**Figura 11. Ruta de biosíntesis de las prostaglandinas.** El ácido araquidónico, obtenido de los fosfolípidos de membrana a partir de la fosfolipasa A<sub>2</sub> citosólica (cPLA<sub>2</sub>), es el precursor de la prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>). Esta prostaglandina, mediante diversas prostaglandinas sintasas (PGS), dará lugar a diversas prostaglandinas entre las que se encuentra la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (modificado de Harris et al. *Trends Immunol* 2002; 23 (3): 144-150<sup>[74]</sup>).

#### 1.4.2.1. CICLOOXIGENASAS (COX)

Desde inicios de los años noventa, se sabe que las dos isoformas de la enzima ciclooxygenasa (COX), COX-1 y COX-2, son las responsables de la producción de la PGH<sub>2</sub>, el primer paso en la biosíntesis de los eicosanoides.

COX-1 y COX-2 son isoenzimas provenientes de genes localizados en los cromosomas 9 y 1, respectivamente. Presentan tamaños muy distintos, siendo la COX-1 mucho más grande que la COX-2 (22 kb frente a 8.3 kb)<sup>[76]</sup> y poseen un 60% de homología. Ambas isoformas catalizan reacciones idénticas y exhiben las mismas constantes cinéticas para la conversión del ácido araquidónico (AA) en prostaglandinas (Figura 11).

La principal diferencia entre estas isoenzimas es la regulación de su expresión y su distribución tisular. Mientras que la COX-1 es ubicua y su expresión es constitutiva, COX-2 es indetectable en la mayoría de los tejidos en condiciones de normalidad, pero su expresión puede ser inducida por una gran variedad de estímulos vinculados a respuesta inflamatoria como son el

LPS, diversas citocinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), factores de crecimiento o promotores tumorales como el PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate)<sup>[73,77]</sup> (Figura 11). Por otra parte, se considera que la COX-1 es utilizada en la biosíntesis inmediata de PGs (varios minutos después de la estimulación por movilización de Ca<sup>2+</sup>), las cuales ejercen funciones homeostáticas, mientras que COX-2 está vinculada a la síntesis retardada de PGs (varias horas después de los estímulos) que ejercen efectos fisiopatológicos<sup>[75,78]</sup>. Asimismo, COX-1 se expresa en el retículo endoplasmático (RE), mientras que COX-2 aparece en la membrana perinuclear.

#### 1.4.2.2. PROSTAGLANDINAS SINTASAS (PGS)

PGH<sub>2</sub> puede ser metabolizada por diferentes rutas enzimáticas dando lugar a diversos productos con importantes efectos biológicos.

\* **PGD Sintasa (PGDS).** Transforma la PGH<sub>2</sub> en PGD<sub>2</sub>. Existen dos isoformas: la PGDS tipo lipocalina, presente mayoritariamente en el líquido cerebroespinal, y la hematopoyética, que produce PGD<sub>2</sub> en múltiples tipos celulares como mastocitos, basófilos y células Th2.

La PGD<sub>2</sub> desarrolla un importante papel en procesos patológicos inflamatorios de tipo Th2 ya que aumenta la expresión de quimiocinas derivadas de macrófagos<sup>[79]</sup>, así como de citocinas y factores pro-inflamatorios como es el GM-CSF y la IL-8<sup>[80]</sup>.

\* **PGE Sintasa (PGES).** Transforman la PGH<sub>2</sub> en PGE<sub>2</sub>. Existen tres isoformas, descritas en mayor profundidad en el apartado 1.4.3.1.

\* **PGH 9-11 endoperoxido reductasa (PGFS).** Genera PGF<sub>2</sub> a partir de PGH<sub>2</sub>. PGF<sub>2</sub> puede ser sintetizada a partir de PGE<sub>2</sub> y PGD<sub>2</sub> mediante otras rutas enzimáticas. PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  desarrolla importantes funciones durante el embarazo y, principalmente, en el momento del parto<sup>[81]</sup>.

\* **PGI Sintasa (PGIS).** Es un miembro de la superfamilia del citocromo P450 que se acopla únicamente a COX-2. Metaboliza PGH<sub>2</sub> en PGI<sub>2</sub>, prostaglandina que posee importantes efectos como vasodilatador.

\* **Tromboxano Sintasa (TXS).** Genera tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) a partir de PGH<sub>2</sub>. El TXA<sub>2</sub> desarrolla múltiples funciones entre las que destaca su papel vasoconstrictor. Fue originalmente identificado en plaquetas y clonado hace más de 15 años. El TXA<sub>2</sub> se acopla preferentemente a COX-2.

#### 1.4.3. **PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)**

La prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) es otro de los prostanoides generados a partir del ácido araquidónico a través de la acción de las enzimas COX, siendo la prostaglandina mayoritariamente producida en la respuesta retardada tras el estímulo.



#### 1.4.3.1. PROSTAGLANDINA E SINTASAS (PGES)

Existen 3 enzimas diferentes que catalizan la generación de  $\text{PGE}_2$  a partir de  $\text{PGH}_2$ :

##### **\* mPGES-1 (PGE Sintasa asociada a membrana o microsomal-1)**

Enzima situada principalmente en la membrana perinuclear, siendo el glutatión un requerimiento específico para que desarrolle su actividad. Sus niveles aumentan en respuesta a estímulos pro-inflamatorios y disminuyen en presencia de glucocorticoides. Se acopla de forma preferencial a COX-2, proceso favorecido por su co-localización en la membrana perinuclear<sup>[75]</sup>. Representa un buen sistema de control celular que facilita la biosíntesis de la  $\text{PGE}_2$ . El principal tipo celular en el que se expresa son los macrófagos. A través de la ruta transcelular, la fosfolipasa  $\text{A}_2$  secretada (sPLA<sub>2</sub>) proporciona ácido araquidónico a la vía COX-2/mPGES-1.

La mPGES-1 se encuentra vinculada a diversos procesos relacionados con el estado inflamatorio. Así, un aumento de los niveles de esta enzima implica:

- Disminución de edema.
- Reducción del número de células blancas presentes en el infiltrado.
- Disminución de la expresión de receptores para quimiocinas en macrófagos como CCR2 y CCR3.

La mPGES-1, combinada con la COX-2, tiene capacidad para alterar y afectar la proliferación y la morfología celular<sup>[82]</sup>. Así, en estudios realizados con células de la línea HEK293 co-transfectadas con ADNc de mPGES-1 y COX-2, se observó una mayor capacidad de proliferación en estas células que en las células transfectadas con COX-1, además de variaciones en la morfología de dicho tipo celular. Debido a estos resultados, actualmente numerosas investigaciones tienen como objetivo el estudio de la posible implicación de esta prostaglandina sintasa en procesos como el cáncer, pérdida de la inhibición por contacto, crecimiento celular independiente de factores de crecimiento y formación de tumores.

Por ello, la mPGES-1 puede representar una diana efectiva en el tratamiento de diversas enfermedades inflamatorias.

##### **\* mPGES-2 (PGE Sintasa asociada a membrana o microsomal-2)**

Su distribución es mucho más restringida que la de la mPGES-1, no estando muy clara su implicación en los procesos inflamatorios ya que su expresión es constitutiva.

**\* cPGES (PGE Sintasa citosólica)**

Como su propio nombre indica, se encuentra situada en el citosol. Lleva a cabo su actividad mediante el acoplamiento exclusivo a COX-1, en ningún caso a COX-2, asociándose con la producción de PGE<sub>2</sub> homeostática.

De esta forma, mPGES-2 y cPGES son enzimas de expresión constitutiva, mientras que mPGES-1 es la que está asociada a procesos en los que se generan estímulos pro-inflamatorios<sup>[78]</sup>. Así, existen 2 rutas biosintéticas de secreción de PGE<sub>2</sub>:

- cPLA2 / COX-1 / cPGES: homeostasis.
- sPLA2/ COX-2 / mPGES-1: generación de PGE<sub>2</sub> en respuesta retardada y, por lo tanto, en condiciones de inflamación y patología.

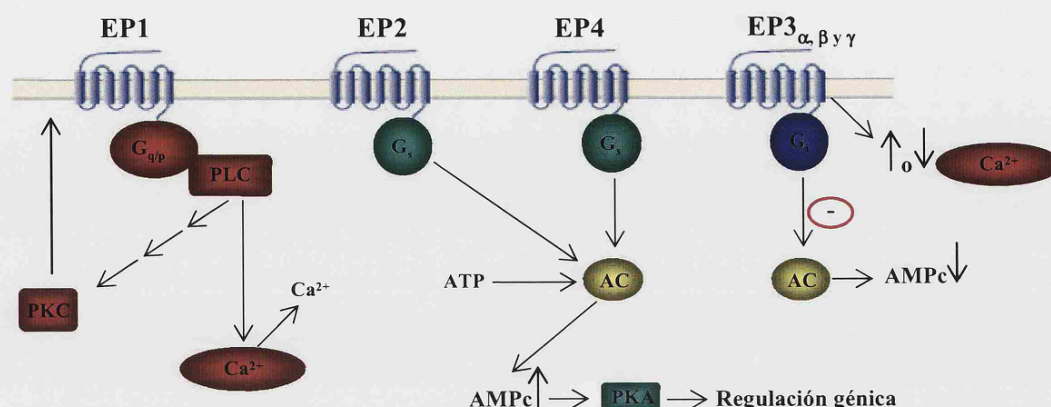
**1.4.3.2. RECEPTORES DE LA PGE<sub>2</sub>**

En la actualidad, están identificados cuatro receptores específicos para la PGE<sub>2</sub> denominados EP1, EP2, EP3 y EP4.

Los receptores EP se caracterizan por presentar 7 dominios transmembranales acoplados, a través de sus secuencias intracelulares, a proteínas G específicas con diversas rutas de señalización de mensajeros secundarios<sup>[74]</sup>. La expresión de los distintos subtipos de receptores está regulada por diversos agentes, muchos de ellos inflamatorios, o por la propia PGE<sub>2</sub>; en función de la expresión de dichos receptores, la PGE<sub>2</sub> actuará en los tejidos de una manera u otra<sup>[83]</sup>.

De forma clásica, se puede organizar a los receptores de la PGE<sub>2</sub> (Figura 12) en tres grupos<sup>[84,85]</sup>:

- \* **EP1.** Aumenta los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular a través de una proteína G<sub>q</sub>.
- \* **EP2 / EP4.** Incremento de la concentración de AMPc intracelular, acoplado a proteínas G<sub>s</sub>, lo que en muchos casos genera la inhibición de las funciones de las células efectoras.
- \* **EP3.** Existen varias isoformas de este receptor. Su principal vía de señalización es a través de la inhibición de la adenilato ciclasa (AC), mediante una proteína G<sub>i</sub>, lo que disminuye los niveles de AMP<sub>c</sub>. Además, puede disminuir o incrementar los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular. Cuando genera un incremento del Ca<sup>2+</sup> intracelular, de igual forma que el receptor EP1, produce un aumento de la actividad celular.



**Figura 12. Receptores de la PGE<sub>2</sub>.** Los cuatro subtipos principales están acoplados a diferentes proteínas G y utilizan distintas rutas de señalización y mensajeros secundarios. Abreviaturas: AC, adenilato ciclasa; PKC, proteína quinasa C; PKA, proteína quinasa A; PLC, fosfolipasa C (modificado de Harris et al. *Trends Immunol* 2002; 23 (3): 144-150<sup>[74]</sup>).

De esta forma y en función de sus propiedades, los receptores de la PGE<sub>2</sub> se pueden dividir en dos grupos<sup>[86]</sup>:

- \* EP1 / EP3. Acoplados a la movilización de Ca<sup>2+</sup> (los dos) e inhibición de la adenilato ciclasa (en el caso de EP3).
- \* EP2 / EP4. Estimulación de la adenilato ciclasa con el consiguiente aumento de AMPc.

El papel de estos receptores en condiciones patológicas está determinado por el perfil de expresión, su afinidad por el ligando y el acoplamiento diferencial a rutas de transducción de señales, destacando la relevancia del contexto celular en el que se encuentre el receptor.

#### 1.4.3.3. EFECTOS FISIOLÓGICOS DE LA PGE<sub>2</sub>

La PGE<sub>2</sub> regula numerosos procesos a nivel sistémico en humanos, desempeñando funciones en el sistema reproductor, gastrointestinal, neuroendocrino e inmune y ejerciendo, de forma estereoespecífica, importantes acciones de tipo celular y tisular en un rango nanomolar<sup>[87]</sup>.

La PGE<sub>2</sub> se muestra como una prostaglandina pleiotrópica, poseyendo propiedades estimuladoras e inhibitoras, debiendo ser considerada, en general, como un elemento regulador de la inmunidad<sup>[88]</sup>.

Con respecto al sistema cardiovascular, desarrolla un papel muy importante ya que aumenta la permeabilidad, contribuyendo de esta forma a la extravasación de fluidos y a la

aparición de edema, siendo crucial para el balance acuoso de los tejidos y teniendo un papel vasodilatador. Además, modula el flujo sanguíneo en recién nacidos.

A nivel gastrointestinal, la  $\text{PGE}_2$  presenta propiedades anti-secretoras y anti-ulcerogénicas, inhibiendo a las células parietales gástricas y aumentando la secreción de bicarbonato, lo que hace que disminuyan los niveles de ácido gástrico. En cuanto a la motilidad gastrointestinal, promueve la contracción de la musculatura longitudinal y relaja la musculatura circular<sup>[89]</sup>.

Con respecto al sistema renal, diversos receptores de la  $\text{PGE}_2$  son expresados a distintos niveles: epitelio tubular, conductos papilares y corticales. Estos patrones de expresión parecen estar relacionados con la regulación del transporte iónico, la reabsorción de agua y la filtración glomerular mediada por esta prostaglandina<sup>[90]</sup>.

A nivel neurológico, interviene en la generación de fiebre frente a determinados estímulos, así como en el dolor<sup>[91]</sup>.

En el aparato reproductor, facilita las contracciones en el momento del parto, además de regular otras funciones a nivel ovárico<sup>[90]</sup>.

Pero es en el proceso inflamatorio vinculado al sistema respiratorio, donde las propiedades y funciones de la  $\text{PGE}_2$  son de nuestro interés y donde mayor controversia existe.

### 1.4.3.4. $\text{PGE}_2$ Y PATOLOGÍAS INFLAMATORIAS PULMONARES

La  $\text{PGE}_2$  es el principal metabolito del tracto respiratorio inferior<sup>[92]</sup>, siendo producida mayoritariamente por el epitelio y la musculatura lisa de las vías aéreas<sup>[92]</sup>.

Ya desde principios de los años 90<sup>[88]</sup>, se le asocia con un papel broncoprotector. Sin embargo, existen discrepancias entre los resultados obtenidos *in vitro* y los observados *in vivo*.

#### **A. PAPEL PERJUDICIAL**

En múltiples trabajos se ha puesto de manifiesto que la  $\text{PGE}_2$  polariza la respuesta celular en un proceso inflamatorio hacia un fenotipo Th2, lo que promueve un aumento en los niveles de expresión de diversas citocinas como la IL-4 y la IL-5<sup>[91]</sup>.

Además, a través de sus efectos a nivel vascular, aumenta la extravasación de líquido de los tejidos, contribuyendo a la formación del edema. En este sentido, la  $\text{PGE}_2$  puede potenciar los efectos de la bradiquinina y la histamina que, *per se*, contribuyen a la extravasación de líquido<sup>[94]</sup>.

En relación a los mastocitos, se ha observado que la  $\text{PGE}_2$ , además de favorecer el efecto de la histamina en la producción de edema, este mediador lipídico puede potenciar el proceso de degranulación y la producción de citocinas por parte de este tipo celular a través de la actuación de su receptor EP3. La activación de este receptor se asocia con un incremento de los niveles de

calcio intracelular, así como con la inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa. También es capaz de incrementar los niveles de interleucina-6 (IL-6), importante interleucina pro-inflamatoria implicada, por ejemplo, en la artritis reumatoide, lo que contribuiría al desarrollo del proceso patogénico<sup>[95]</sup>.

A través de este mismo receptor, la PGE<sub>2</sub> actúa en las fases tempranas de los procesos inflamatorios agudos. Además de inducir vasoconstricción, la activación de EP3 por la PGE<sub>2</sub> induce la quimiotaxis de neutrófilos, así como la liberación, por parte de este tipo celular, de LTB<sub>4</sub>. Esta acción estimularía la liberación de otros mediadores inflamatorios desde células residentes e infiltrantes en el tejido, promoviendo las fases tempranas de los procesos inflamatorios agudos. De esta forma la PGE<sub>2</sub>, mediante EP3, podría contribuir a la respuesta inflamatoria, y más concretamente en la cutánea, por un mecanismo dependiente de leucocitos<sup>[96]</sup>.

## **B. PAPEL PROTECTOR**

La PGE<sub>2</sub> no sólo protege frente a la broncoconstricción (inducida por ejercicio, por alérgeno, por aspirina o por agentes broncoconstrictores como la histamina o la metacolina), sino que también inhibe la inflamación de las vías aéreas mediante diversos mecanismos:

- \* Disminuyendo la eosinofilia de las vías aéreas.
- \* Alterando la presentación antigénica por células dendríticas mediante la anulación, de forma indirecta, de la expresión de moléculas de histocompatibilidad de clase II (MHC-II)<sup>[97]</sup>. La capacidad de las células dendríticas para actuar como células presentadoras de antígeno está relacionada con la producción de citocinas, especialmente con la IL-12. Dicha citocina es inhibida por la IL-10 cuya producción es potenciada por la PGE<sub>2</sub>. Así, al incrementar los niveles de IL-10, los cuales inhiben a la IL-12, la PGE<sub>2</sub> inhibe indirectamente la capacidad de las células dendríticas para presentar antígeno<sup>[98]</sup>.
- \* Inhibiendo la migración transendotelial y la expresión de moléculas de adhesión como VCAM-1, ICAM-1 y ELAM-1 (molécula 1 de adhesión leucocitaria endotelial). La inhibición de ICAM-1 parece estar mediada por la inhibición del factor de necrosis tumoral-alpha (TNF- $\alpha$ )<sup>[99]</sup>.

A nivel del infiltrado inflamatorio, esta prostaglandina<sup>[100]</sup>:

- \* Inhibe la liberación de mediadores desde los mastocitos pulmonares. Se observó que en fragmentos de tejido parenquimatoso pulmonar estimulados con anti-IgE a concentraciones iguales o superiores a 0,3 µg/mL, la PGE<sub>2</sub> en rango micromolar (1 µM) era capaz de inhibir el 50% de la liberación de histamina<sup>[101]</sup>, siendo esta inhibición dosis-dependiente.
- \* Disminuye la quimiotaxis y supervivencia eosinofílica mantenida por la estimulación por citocinas. Alam y colaboradores<sup>[102]</sup> evaluaron los efectos del Misoprostol (un análogo de la PGE<sub>2</sub>) sobre las reacciones alérgicas tempranas y tardías. Parte de estos estudios se centraron en la acción de dicho agonista sobre la quimiotaxis y supervivencia eosinofílica. Comprobaron que el Misoprostol, además de inhibir selectivamente la respuesta tardía, reduce el número de células inflamatorias así como la quimiotaxis de eosinófilos. También se ha observado que la PGE<sub>2</sub> exógena controla negativamente el reclutamiento de eosinófilos a las zonas de inflamación alérgica, mientras que la inhibición de la biosíntesis endógena de dicha prostaglandina incrementa la infiltración eosinofílica en respuesta a alérgenos<sup>[103]</sup>.
- \* Inhibe la producción, por parte de los linfocitos B, de IgE inducida por IL-4. La PGE<sub>2</sub>, junto con el IFN-γ e IFN-α, inhibe la expresión inducida por IL-4 del receptor de baja afinidad para la porción Fc de IgE (CD23) en las células B, lo que influye en la producción de IgE y, además, demuestra la asociación entre la expresión de CD23 y la producción de IgE inducida por IL-4<sup>[104]</sup>.
- \* Suprime la síntesis de determinadas quimiocinas generadas por macrófagos, por ejemplo la proteína inflamatoria de macrófagos-1β (MIP-1β). Esta acción, mediada principalmente por el receptor EP4, podría minimizar la propagación de la inflamación iniciada por macrófagos. Así, el tándem PGE<sub>2</sub>-EP4 proporcionaría una nueva estrategia terapéutica para enfermedades o procesos inflamatorios patogénicos como la aterogénesis<sup>[105]</sup>.

Por otro lado, sus efectos protectores también se reflejan en la musculatura lisa, componente de vital importancia en la hiperreactividad bronquial y el proceso de remodelación. Así, Pierzchalska y cols<sup>[106]</sup> demostraron que la PGE<sub>2</sub> protege frente a la inflamación y evita la proliferación de las células epiteliales, los fibroblastos y las células musculares lisas. En este sentido, también se observaron propiedades relajantes de la PGE<sub>2</sub> sobre los bronquios a través de

un mecanismo mediado por el receptor EP2. Además, la activación de este receptor en las células musculares lisas de las vías aéreas genera una disminución de la producción de citocinas y la proliferación de este tipo celular, lo que provocaría una atenuación del proceso de remodelación<sup>[107]</sup>. Estos datos sugieren que el receptor EP2 podría ser una adecuada diana terapéutica en el pulmón ya que podría prevenir la contracción de la musculatura lisa de las vías aéreas y reducir la inflamación pulmonar.

Por todo ello, la PGE<sub>2</sub> es un mediador lipídico de gran trascendencia en el estudio de las patologías respiratorias, puesto que es capaz de modular múltiples elementos característicos, tanto del asma como de la bronquitis eosinofílica.

## 1.5. EL PROCESO DE REMODELACIÓN Y LA MUSCULATURA LISA BRONQUIAL

El proceso de remodelación bronquial fue descrito por primera vez por Huber y Koessler en 1922, siendo este trabajo el primer estudio sistemático sobre la proporción de músculo liso en las vías aéreas de sujetos asmáticos<sup>[108]</sup>.

Inicialmente, este proceso tiene una función beneficiosa durante el desarrollo pulmonar normal o en respuesta a una agresión; sin embargo, se transforma en perjudicial en aquellas situaciones en las que adquiere un carácter crónico y asocia una estructura o funcionalidad tisular alteradas<sup>[109]</sup>.

De forma breve, el proceso de remodelación o *remodeling* es la aparición de alteraciones en la arquitectura bronquial que modifican su funcionalidad.

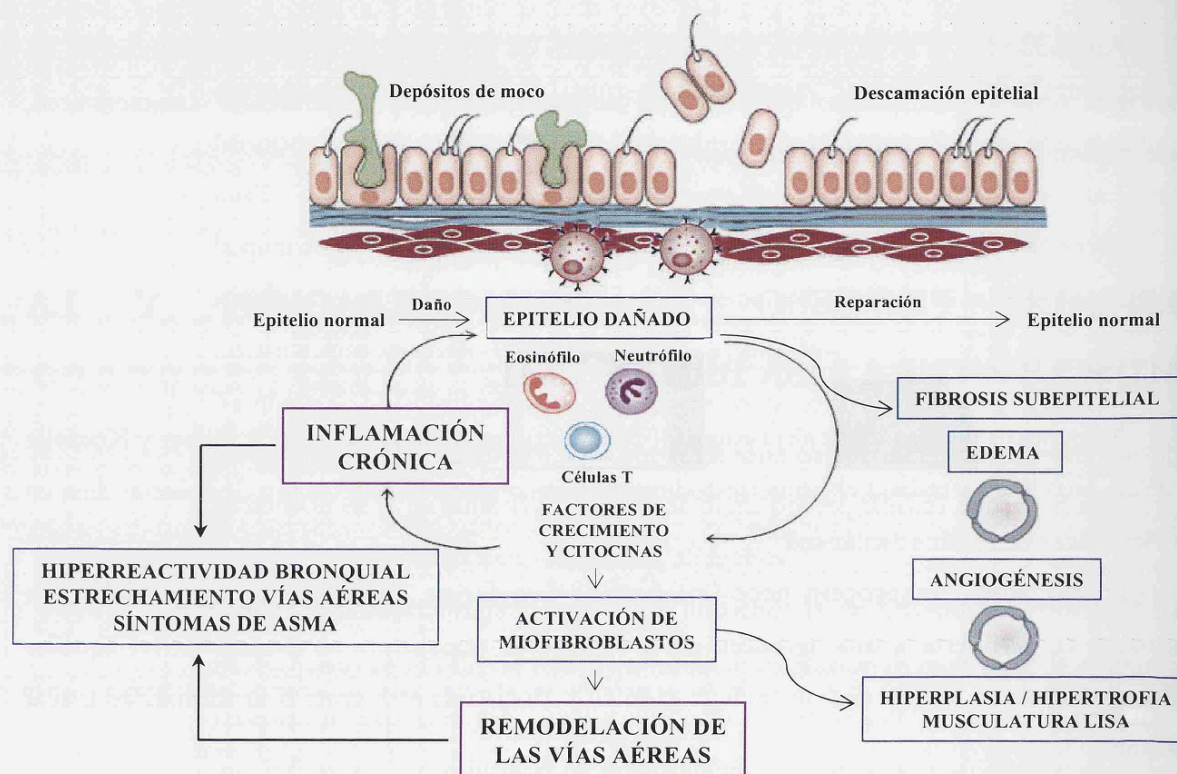
La remodelación de las vías respiratorias se caracteriza por<sup>[110]</sup>:

- Descamación epitelial.
- Fibrosis subepitelial.
- Incremento de la musculatura lisa (hipertrofia y/o hiperplasia).
- Disminución de la distancia entre el epitelio y las células musculares lisas (CML).
- Hiperplasia de las células productoras de moco o células goblet y las glándulas mucosas.
- Proliferación de los vasos sanguíneos o angiogénesis.
- Desarrollo de edema.



Existen dos teorías acerca del inicio de este mecanismo<sup>[111]</sup>:

- Los cambios en el proceso de remodelación son consecuencia directa de la inflamación crónica en individuos genéticamente predispuestos.
- La inflamación y el proceso de remodelación son fenómenos que transcurren de forma paralela<sup>[70]</sup>.



**Figura 13.** Esquema del proceso de remodelación y alteración de la unidad epitelio mesenquimal característicos de la patología asmática. Estos procesos engloban la infiltración mastocitaria en la musculatura lisa, la alteración del epitelio y el reclutamiento inflamatorio con la consecuente producción de citocinas y factores de crecimiento que contribuyen al estatus inflamatorio. Todos estos elementos ejercen una retroalimentación positiva y favorecen la cronicidad del daño (modificado de Holgate et al. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 11 (1): S18-S36<sup>[70]</sup>).

La matriz extracelular es otro componente de vital importancia en el proceso de remodelación bronquial, ya que su renovación es un importante elemento modulador de la biología pulmonar. Así, cambios proteicos en la composición de la matriz afectan a características funcionales de la musculatura lisa<sup>[112]</sup>. El proceso de remodelación se caracteriza por el depósito de materiales como colágeno tipo III y V, laminina, tenascina y fibronectina. El equilibrio entre síntesis y degradación de matriz extracelular regulado por las metaloproteasas (MMPs), encargadas de la degradación de las proteínas de la matriz, y sus inhibidores (TIMPs), es lo que caracteriza a esta estructura que posee un carácter dinámico (Figura 13). Ese depósito de



colágeno subepitelial está favorecido en gran medida por el TGF- $\beta$  siendo éste, además, un importante factor pro-fibrótico. Así, los fibroblastos activados por el TGF- $\beta$  y otros factores, mediante la deposición de colágeno y fibronectina (también de proteoglicanos), contribuyen al engrosamiento de la membrana basal, dando lugar a la fibrosis subepitelial (Figura 13). Todos estos procesos, a su vez, influyen en la plasticidad de la musculatura lisa, característica de gran importancia en la hiperreactividad bronquial<sup>[113]</sup>.

Al mismo tiempo, y como se ha comentado previamente, hay un aumento de la red de vascularización de la submucosa, con extravasación y producción de edema, y una degeneración del cartílago, lo que afecta a la cohesión de la íntima de la vía aérea con el parénquima pulmonar<sup>[114]</sup> (Figura 13).

En 1993, Ebina y colaboradores<sup>[115]</sup> clasificaron la patología asmática en función del patrón de hiperplasia muscular existente:

- \* Tipo I. Existencia de hiperplasia de células musculares únicamente en las vías aéreas centrales.
- \* Tipo II. Incremento de la masa muscular (hipertrofia) en vías respiratorias centrales y periféricas y, en algunas ocasiones, hiperplasia en zona central<sup>[116]</sup>.

Estos procesos de hipertrofia e hiperplasia muscular podrían llegar a inducir o favorecer una limitación no reversible al flujo aéreo, siendo éste un elemento fundamental en el progreso y la gravedad de la patología<sup>[117]</sup>.

Gracias a su función sintética, las CML son capaces de secretar citocinas y quimiocinas inmunomoduladoras que, junto a las citocinas producidas por diversas células inflamatorias, van a activar la proliferación muscular. Las principales citocinas implicadas son: IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-13, mediadores lipídicos como LTD<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub> (importantes efectos broncoprotectores), factores de crecimiento como TGF- $\beta$ , factor de crecimiento epidérmico (EGF), etc. De esta forma, aunque tradicionalmente se consideró al tejido muscular liso como un mero regulador del tono broncomotor, se ha comprobado que su participación es importante tanto en la perpetuación de la inflamación como en la remodelación de las vías aéreas<sup>[118]</sup>.

Así, la conjunción de todos estos procesos conlleva una repercusión funcional y clínica importante, por lo que la efectividad de los tratamientos actuales sobre estos factores ha sido y es objeto de numerosos estudios.

## 1.6. APOPTOSIS

La apoptosis o muerte celular programada supone la pérdida de viabilidad de la célula que, además, va acompañada de una serie de procesos como son la alteración del citoplasma, la condensación de la cromatina y la fragmentación del ácido desoxirribonucleico (ADN). Este proceso juega un papel fundamental en la homeostasis celular, es decir, en el mantenimiento del balance entre supervivencia y muerte celular; también en el desarrollo y en las funciones del sistema inmune, siendo un importante mecanismo de defensa frente a infecciones virales y procesos tumorales emergentes<sup>[119,120,121]</sup>. Puede desencadenarse, aunque no exclusivamente, a través de dos vías principales:

- \* Activación directa de la cascada de las caspasas por unión del ligando al receptor de muerte celular.
- \* A través de estímulos como son los fármacos, las radiaciones, los agentes infecciosos y las especies reactivas de oxígeno, iniciando la liberación de Citocromo C al citosol desde la mitocondria, el cual une el Factor activador-1 de la proteasa apoptótica (Apaf-1) constituyendo una proteína de estructura ternaria denominada apoptosoma, que reclutará y activará a la caspasa-9, la cual disparará el final de la cascada del proceso apoptótico<sup>[122]</sup>.

Debido a la importancia de este proceso, es necesario que esté sujeto a importantes y eficientes mecanismos de regulación, ya que el desarrollo de un proceso apoptótico excesivo y/o inapropiado puede contribuir, en determinados casos, a la patogénesis de enfermedades respiratorias que cursan con inflamación crónica<sup>[123]</sup>.

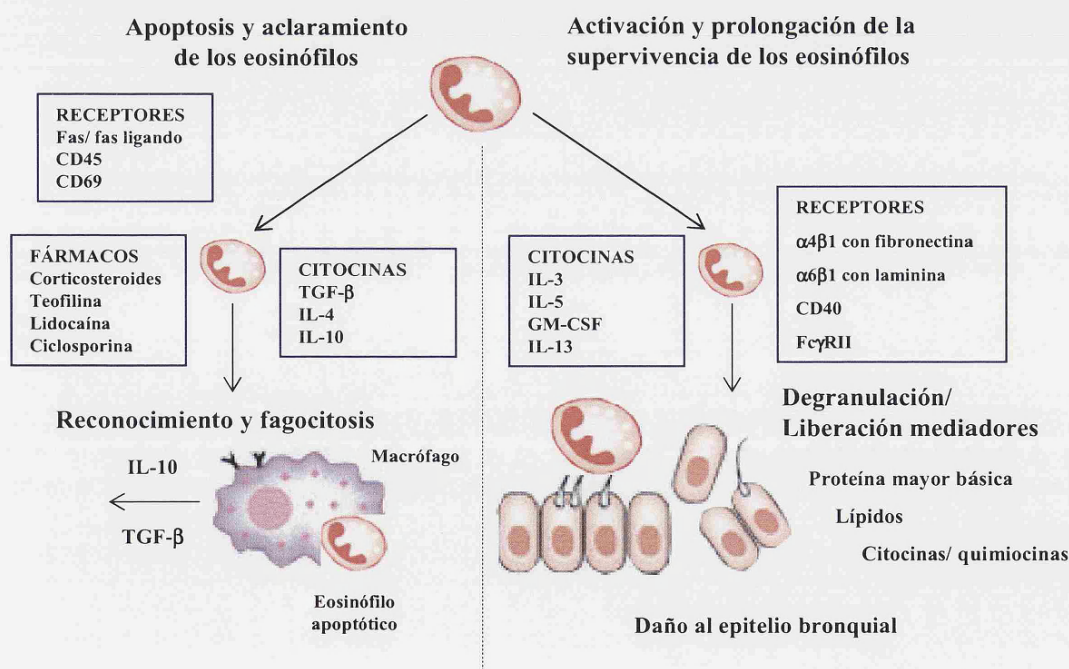
En estos procesos inflamatorios un requisito previo para su resolución es el retorno a la normalidad mediante la reversión de los mecanismos implicados en la iniciación de la inflamación. Algunos de estos mecanismos son:

- Eliminación de estímulos.
- Restauración de la permeabilidad vascular normal.
- Disipación o destrucción de mediadores pro-inflamatorios.
- Cese de migración y maduración en médula ósea y extravasación de granulocitos a los tejidos.
- Limitación de la secreción de gránulos y agentes histotóxicos y citotóxicos.

Un fallo en estos mecanismos de reversión responsables de la resolución de la inflamación y restauración de la homeostasis, podría desembocar en respuestas inflamatorias persistentes que incrementarían el daño tisular y el estatus de gravedad de la enfermedad<sup>[124]</sup>.

En estas enfermedades en las que el proceso inflamatorio juega un papel clave en su patogénesis, el proceso de “aclaramiento celular” (Figura 14) es primordial en la limitación del daño tisular, contribuyendo de forma favorable a la reducción de la inflamación mediante dos mecanismos:

- \* A diferencia de lo que ocurre en la necrosis, las células apoptóticas son eliminadas antes del fenómeno de lisis por fagocitosis, lo que previene la liberación del contenido intracelular pro-inflamatorio e inmunogénico<sup>[125]</sup>.
- \* La fagocitosis de las células apoptóticas no sólo inhibe la inducción de mediadores pro-inflamatorios, sino que estimula la producción de diversos factores ( $\text{TGF-}\beta$ ) y, en ocasiones, citocinas (IL-10) y mediadores lipídicos ( $\text{PGE}_2$ ), los cuales inhiben la liberación de citocinas, quimiocinas y eicosanoides pro-inflamatorios<sup>[126]</sup>.



**Figura 14.** Esquema del desarrollo de los mecanismos de apoptosis y aclaramiento de los eosinófilos, así como los de supervivencia y activación. El mecanismo de apoptosis eosinofílica conlleva el reconocimiento y fagocitosis de los eosinófilos apoptóticos por los macrófagos. La activación y prolongación de la supervivencia eosinofílica conlleva la liberación de mediadores cuyo resultado es el daño al epitelio bronquial (modificada de Walsh *Br J Haematol* 2000; 111 (1): 61-67<sup>[127]</sup>).

Además de la apoptosis *in situ*, otro mecanismo de aclaramiento celular tisular que contribuiría a la reducción de la inflamación en diversas patologías respiratorias, es la salida de granulocitos hacia el lumen de las vías aéreas, habiéndose demostrado que tanto la migración eosinofílica a través del epitelio como la salida de neutrófilos hacia el espacio aéreo, contribuyen a la resolución de la inflamación<sup>[128]</sup>.

La principal célula efectora de la fagocitosis de las células apoptóticas es el macrófago. Sin embargo, se ha demostrado el importante papel que las células dendríticas, los fibroblastos, los hepatocitos<sup>[50]</sup>, las células epiteliales y las células musculares lisas<sup>[127]</sup> pueden desempeñar como fagocitos no profesionales en el reconocimiento y eliminación de las células apoptóticas.

Como se ha comentado previamente, el eosinófilo es el tipo celular característico del infiltrado inflamatorio de patologías como el asma y la bronquitis eosinofílica contribuyendo, entre varios efectos, con la liberación del contenido de sus gránulos a la disfunción ciliar y daño tisular<sup>[129]</sup>. La supervivencia de los eosinófilos en los tejidos promueve la perpetuación de la inflamación. Así, existen numerosos factores que contribuyen a la supervivencia o inhiben los mecanismos apoptóticos en este tipo celular<sup>[50]</sup>:

- \* IL-3, GM-CSF, IL-5: aumentan la supervivencia.
- \* IL-13: aumenta la supervivencia potenciándose su acción en presencia de TNF- $\alpha$ .
- \* IL-9: estimula la liberación de IL-16 y RANTES además de incrementar la expresión del receptor de IL-5, lo que promueve la diferenciación y prolongación de la supervivencia eosinofílica.

Otros factores y condiciones que promueven o inhiben la apoptosis con la consiguiente mejora o promoción del estado inflamatorio se detallan en la Tabla IV.

Factores que aumentan la apoptosis	Factores que disminuyen la apoptosis
Cicloheximida	LPS
TNF- $\alpha$	Hipoxia
Donadores de NO	IL-5, IL-4 e IL-9
Leucocidina <sup>[130]</sup>	IL-6: induce Bcl-2 o TIMP1
Bax, Bcl-xs <sup>[127]</sup>	Bcl-2, Bcl-xl <sup>[127]</sup>
Citocinas Th1. IFN- $\gamma$ , IL-2: aumentan expresión de Fas <sup>[122]</sup>	Aumento de calcio intracelular
Hiperoxia	Aumento AMPc
Ang-II y angiotensinógeno: inducen hiperoxia <sup>[120]</sup>	Agentes que incrementan el calcio extracelular
Unión Fas-FasL: expresión en linfocitos T activados	IL-11, GM-CSF: disminuyen apoptosis inducida por hiperoxia <sup>[120]</sup>

**Tabla IV. Factores que influyen en la inducción o inhibición de la apoptosis.** Existen numerosos factores de distinta naturaleza (citocinas, características físicas del medio como la concentración de oxígeno, mensajeros secundarios, etc...) que pueden favorecer o dificultar el proceso apoptótico lo que, finalmente, incidiría en el grado de inflamación existente.

De esta forma, dada la probada importancia del mecanismo apoptótico en la resolución de la inflamación, uno de los objetivos potenciales de la terapia anti-asmática es restaurar la sensibilidad a la apoptosis de las células infiltrantes de las vías aéreas, es decir, principalmente la de los eosinófilos. Existen diversos fármacos empleados en el tratamiento del asma y bronquitis eosinofílica que inciden sobre dicho mecanismo:

- \* Glucocorticoides. Aceleran la apoptosis eosinofílica y la fagocitosis por parte de los macrófagos, inhibiendo la síntesis de citocinas pro-inflamatorias<sup>[122,127]</sup>.
- \* Teofilina. Induce la apoptosis de eosinófilos activados por IL-3 mediante la disminución de la expresión de Bcl-2<sup>[122]</sup>.
- \* Sulfonilúreas y ciclosporina A. Inhiben la supervivencia eosinofílica mediante la inducción de apoptosis<sup>[127]</sup>.
- \* Antagonistas de los receptores para LTs o inhibidores de la síntesis de LTs. Disminuyen la síntesis de leucotrienos lo que finalmente influye en la activación y supervivencia de los eosinófilos.

## 1.7. MÉTODOS NO INVASIVOS EN LA EVALUACIÓN DE LA INFLAMACIÓN DE LAS VÍAS AÉREAS

La inflamación crónica de las vías aéreas se considera la base fisiopatológica subyacente del asma, por lo que es necesario disponer de marcadores que permitan cuantificar el componente inflamatorio.

El diagnóstico del asma se basa en la conjunción de la información obtenida a partir de la historia clínica, la exploración física y las pruebas funcionales pulmonares<sup>[15]</sup>. Sin embargo, en ocasiones, los resultados de todos estos estudios no son totalmente concluyentes para el diagnóstico. Por ello, se recomienda la evaluación directa de la vía respiratoria bronquial.

Aunque en la década de los 80 la introducción del uso del fibrobroncoscopio permitió la obtención tanto de muestras de la pared bronquial (biopsia), como del material que recubre la superficie (cepillado), así como del líquido que baña la luz bronquial (lavado broncoalveolar o LBA), es una prueba altamente invasiva y de grandes requerimientos técnicos (infraestructura y equipamiento humano), por lo que es inviable en la rutina clínica y, más aún, en la monitorización seriada del asma<sup>[131]</sup>.

Así, se han desarrollado una serie de técnicas no invasivas para evaluar la inflamación de las vías respiratorias. Las principales son: el condensado de aire exhalado, el óxido nítrico exhalado (eNO) y el esputo inducido<sup>[132]</sup>.

### 1.7.1. Condensado de aire exhalado

Es una técnica rápida, sencilla y no invasiva que sólo requiere por parte del paciente la respiración a volumen corriente durante un período de, aproximadamente, 15 minutos.

Se basa en el enfriamiento del aire exhalado, condensándose el vapor de agua en el que se encuentran disueltas partículas desprendidas del líquido que baña la vía aérea. Dicha condensación permite obtener una matriz líquida que se utiliza para evaluar cuantitativamente trazas de biomarcadores no volátiles tales como proteínas, lípidos, nucleótidos y productos de la oxidación<sup>[131]</sup>.

Existen estudios con pacientes asmáticos en los que, mediante esta técnica, se han detectado niveles elevados de marcadores de estrés oxidativo e inflamación de las vías aéreas como citocinas, eicosanoides, oxidantes nitrogenados y peróxido de hidrógeno<sup>[133]</sup>.

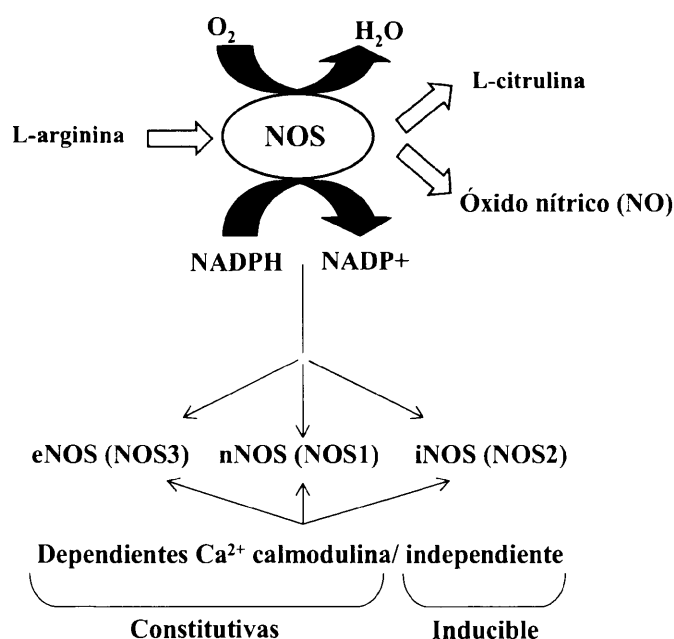
Sin embargo, aún no se han estandarizado muchos aspectos de esta técnica como la conveniencia o no de utilizar pinza nasal<sup>[134]</sup>, o la posibilidad de que existan interferencias entre la composición del condensado de aire exhalado y el material del tubo colector (generalmente de

polipropileno), o la propia composición del aire ambiental. Pero la principal fuente de controversia a la hora de utilizar este tipo de muestra para el análisis de los componentes volátiles existentes en la zona de inflamación, es el considerar o no el grado de dilución en la expresión de los resultados<sup>[131]</sup>.

Por todos estos factores negativos que podrían conducir a conclusiones erróneas, el condensado de aire exhalado no está instaurado como prueba de rutina en el estudio de enfermedades respiratorias como el asma.

### 1.7.2. Óxido nítrico exhalado

El óxido nítrico exhalado (eNO) fue detectado por primera vez en el aire exhalado en 1991, siendo en 1993 cuando se publicó el primer trabajo en el que se vinculaba el asma con niveles elevados de eNO. Esta asociación entre un aumento de la fracción de óxido nítrico en aire exhalado y asma ha sido observada en diversas poblaciones<sup>[135]</sup>.



**Figura 15. Reacción de biosíntesis del óxido nítrico.** La iNOS (NOS2) es la enzima que actuaría en la producción de NO tras ser inducida por estímulos inflamatorios.

Así, se ha confirmado que el NO (óxido nítrico), además de desempeñar un relevante papel vasodilatador en el sistema cardiovascular, ejerce importantes efectos fisiológicos en funciones como la neurotransmisión periférica y central<sup>[136]</sup>. El NO es un derivado del ácido amino

L-arginina. Es producido por tres isoformas de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), dos de ellas constitutivas, NOS1 y NOS3 que son dependientes de calmodulina, y una tercera inducible, iNOS o NOS2 (independiente de calmodulina), habiéndose encontrado una elevada expresión de esta última en el epitelio bronquial de pacientes asmáticos<sup>[137]</sup> (Figura 15).

De esta forma, la evaluación del óxido nítrico exhalado proporciona un marcador alternativo no invasivo de inflamación que se caracteriza por ser rápido, barato, de fácil obtención y cómodo para el paciente<sup>[138]</sup>, pudiendo ser incluso, según algunos autores, un práctico marcador de la respuesta al tratamiento con corticosteroides inhalados (CI)<sup>[135]</sup>.

Sin embargo, al igual que ocurre con el condensado de aire exhalado, ciertos parámetros de esta técnica necesitan ser estandarizados. Así, el principal problema es el punto de corte a partir del cual se podría excluir, de forma fidedigna, el diagnóstico de asma, empleándose distintos puntos de corte<sup>[139,140]</sup>. Además, muchos estudios sobre óxido nítrico exhalado están centrados en niños, observándose un alto grado de solapamiento entre los valores de eNO en los niños sanos y los niños con bronquitis recurrente<sup>[141]</sup>, así como en el caso de asma leve intermitente<sup>[142]</sup>, no siendo una herramienta útil en la predicción del grado de hiperreactividad de las vías aéreas.

Actualmente, en contra de algunos estudios, no es clara su utilidad en la predicción de la respuesta al tratamiento con CI en pacientes con tos crónica. Hahn y colaboradores<sup>[143]</sup>, en un trabajo con pacientes con tos crónica, observaron una correlación entre el valor de eNO y la respuesta al tratamiento con CI; así, los pacientes con valores elevados de eNO presentaban una mayor probabilidad de mejorar con los corticosteroides, mientras que los sujetos con valores normales o bajos de eNO prácticamente no respondían a dicho tratamiento, considerando el valor de eNO un parámetro de bastante precisión en la evaluación del comportamiento tras la toma de este fármaco. Sin embargo, un estudio realizado recientemente por Luis Prieto y colaboradores<sup>[144]</sup> en una población similar de individuos con tos crónica corroboró que, aunque los pacientes con tos crónica responden bien a la terapia con CI, el valor basal del eNO no es útil para predecir los pacientes que se comportarán como buenos respondedores para dicho tratamiento.

Por último, existen numerosos factores limitantes de la validez y utilidad del eNO ya que alteran sus niveles. Algunos de estos factores son:



- Contaminación por NO ambiental.
- Contaminación por NO nasal.
- Influencia del flujo espiratorio: a menor flujo, mayor valor de eNO<sup>[141]</sup>.
- Sexo<sup>[140]</sup>.
- Edad. Existe una correlación positiva, de manera que a medida que la edad aumenta se incrementan los valores de eNO en niños sanos<sup>[145]</sup>.
- Infecciones virales del tracto respiratorio superior aumentan su valor.
- Ingestión de alimentos ricos en nitratos<sup>[139]</sup>.

Por todo ello el eNO, aunque presenta ciertas ventajas, no es todavía un claro elemento diagnóstico ni se encuentra estandarizado para la práctica clínica rutinaria en la gran mayoría de los centros, aunque proporciona información fiable.

### 1.7.3. El esputo inducido

La tendencia en la práctica clínica de los últimos 50 años ha sido intentar reducir el uso de técnicas invasivas para el diagnóstico de enfermedades de las vías aéreas. Una de las metodologías no invasivas más útil para el estudio de la inflamación de las vías respiratorias ha sido el desarrollo de la técnica del esputo inducido (EI).

Aunque el primer protocolo para la obtención del esputo fue establecido por Bickerman en 1958<sup>[146]</sup>, ha sido en los años ochenta y noventa cuando este procedimiento ha sido estudiado y estandarizado para reducir la variabilidad y los posibles efectos adversos en los pacientes<sup>[147]</sup>. Desde entonces, diferentes estudios han demostrado la alta efectividad del análisis del esputo inducido en el diagnóstico de procesos inflamatorios en las vías aéreas.

El estudio del esputo inducido permite conocer las complejas relaciones entre células inflamatorias, mediadores y citocinas, así como los mecanismos que tienen lugar en el asma, pudiendo ser usado para evaluar los efectos de diversos medicamentos sobre la inflamación de las vías aéreas y relacionar sus efectos antiinflamatorios con los síntomas y alteraciones de la función de la vía respiratoria<sup>[148]</sup>. Así, en el año 2000, el grupo de F.E. Hargreave<sup>[149]</sup> estableció que el examen del esputo permite identificar la presencia, tipo e intensidad de la inflamación de las vías aéreas, la existencia o no de microaspiración, la disfunción del ventrículo izquierdo e, incluso, la implicación del pulmón en enfermedades metabólicas. Además, esta técnica puede ser llevada a cabo de forma exitosa y segura en la práctica clínica, incluso en caso de asma moderado o severo<sup>[150]</sup>.

El esputo, definido como la expectoración de las secreciones respiratorias de las vías bajas, está constituido por un componente líquido y uno celular, el cual incluye células epiteliales bronquiales y células inflamatorias. En la expectoración se mezcla con saliva, compuesta principalmente por líquido o fluido, células epiteliales escamosas y bacterias orofaríngeas, siendo la fracción viscosa la considerada como esputo<sup>[151]</sup>. Tanto la fase sólida del esputo (fracción celular) como la fase líquida (sobrenadante) nos permiten evaluar una gran variedad de parámetros.

Por un lado, mediante el uso de técnicas como la citometría de flujo, *cytospin* o citocentrifugación o el conteo celular manual (Ej. Uso de cámara de Neubauer o Fuchs-Rosenthal), es posible establecer el patrón celular presente en el foco inflamatorio, así como el tipo celular predominante en una determinada patología. Además, estudios a nivel génico de este infiltrado inflamatorio permiten conocer si existe o no sobreexpresión de determinados genes de interés.

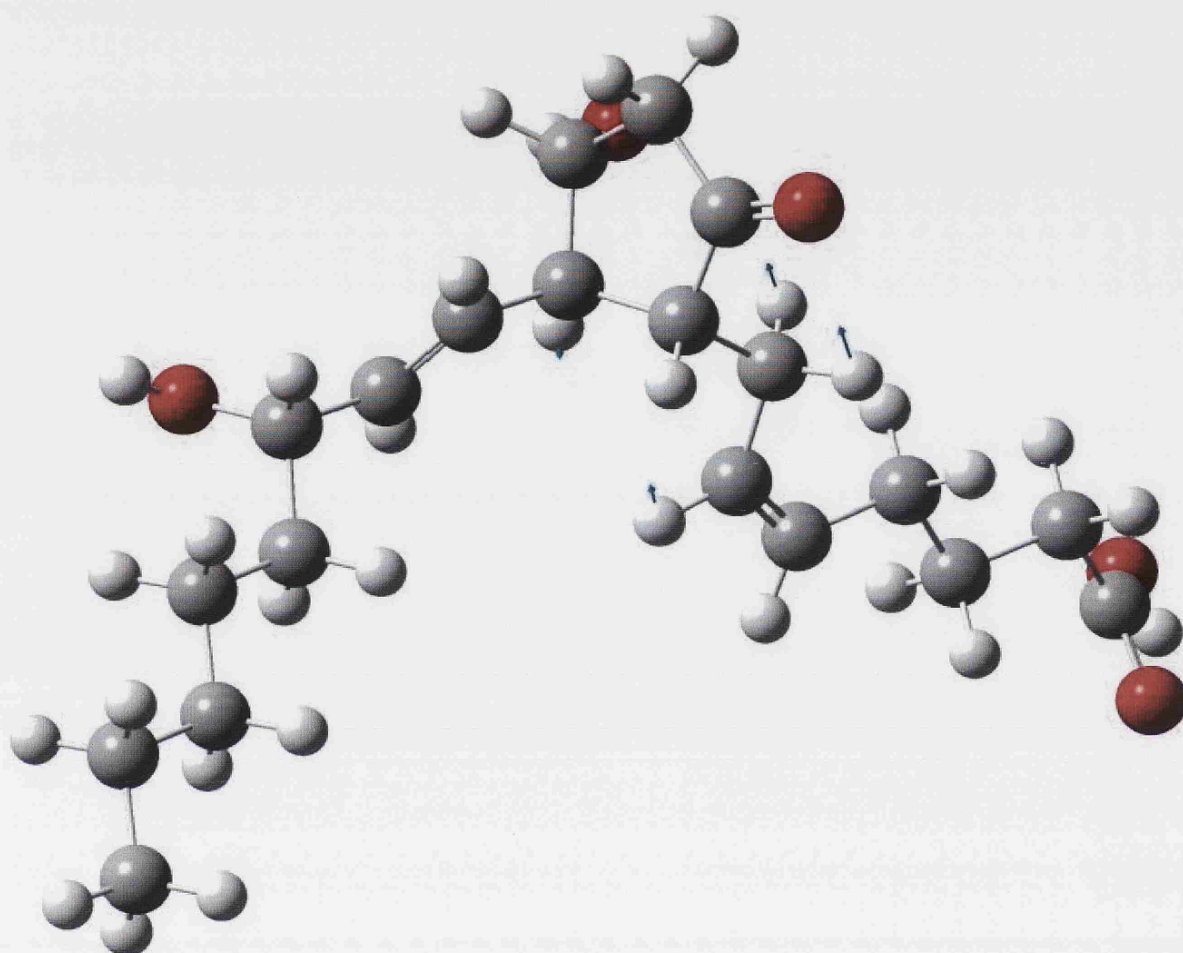
Por otro lado, la fase líquida o sobrenadante es una muestra de gran utilidad e importancia ya que en ella se pueden evaluar niveles de citocinas, mediadores pro-inflamatorios y otros factores (factores de crecimiento, reguladores, etc) que permitirán acceder a un mayor conocimiento sobre las características del microambiente pulmonar existente en cada patología respiratoria objeto de estudio.

El éxito en la obtención del esputo mediante su inducción a través de la nebulización de salino hipertónico, está influido por una serie de factores tanto técnicos (tipo de nebulizador, tamaño de la partícula, concentración de suero salino, pre-tratamiento o no con salbutamol) como no técnicos (nivel de control del asma, hábito tabáquico, presencia de otras enfermedades inflamatorias), estableciéndose como condiciones óptimas el uso de un nebulizador ultrasónico con suero salino hipertónico (3%, 4% y 5%) y la administración previa de salbutamol (agonista  $\beta_2$  de acción corta), ya que evita la broncoconstricción mediante la relajación de la musculatura sin afectar al componente celular, además de inhibir la liberación de mediadores mastocitarios como la histamina<sup>[152]</sup>.

Además de la metodología empleada en la inducción del esputo, es muy importante el manejo y tratamiento posterior de la muestra para eliminar el componente mucoso que suele envolver los paquetes celulares, dificultando el acceso a ellos. El ditriotreitol (DTT) es el agente dispersante más eficaz, ya que rompe los puentes disulfuro de la matriz mucoproteica liberando el componente celular<sup>[153]</sup>.

Así, tanto por su fácil obtención y manejo, como por la gran cantidad de información que nos proporciona, el esputo obtenido mediante inducción con suero salino hipertónico es una muestra de gran valía en el estudio y diagnóstico de múltiples enfermedades respiratorias y, más concretamente, en las patologías abordadas en este estudio: asma y bronquitis eosinofílica.





## *2. Objetivos*



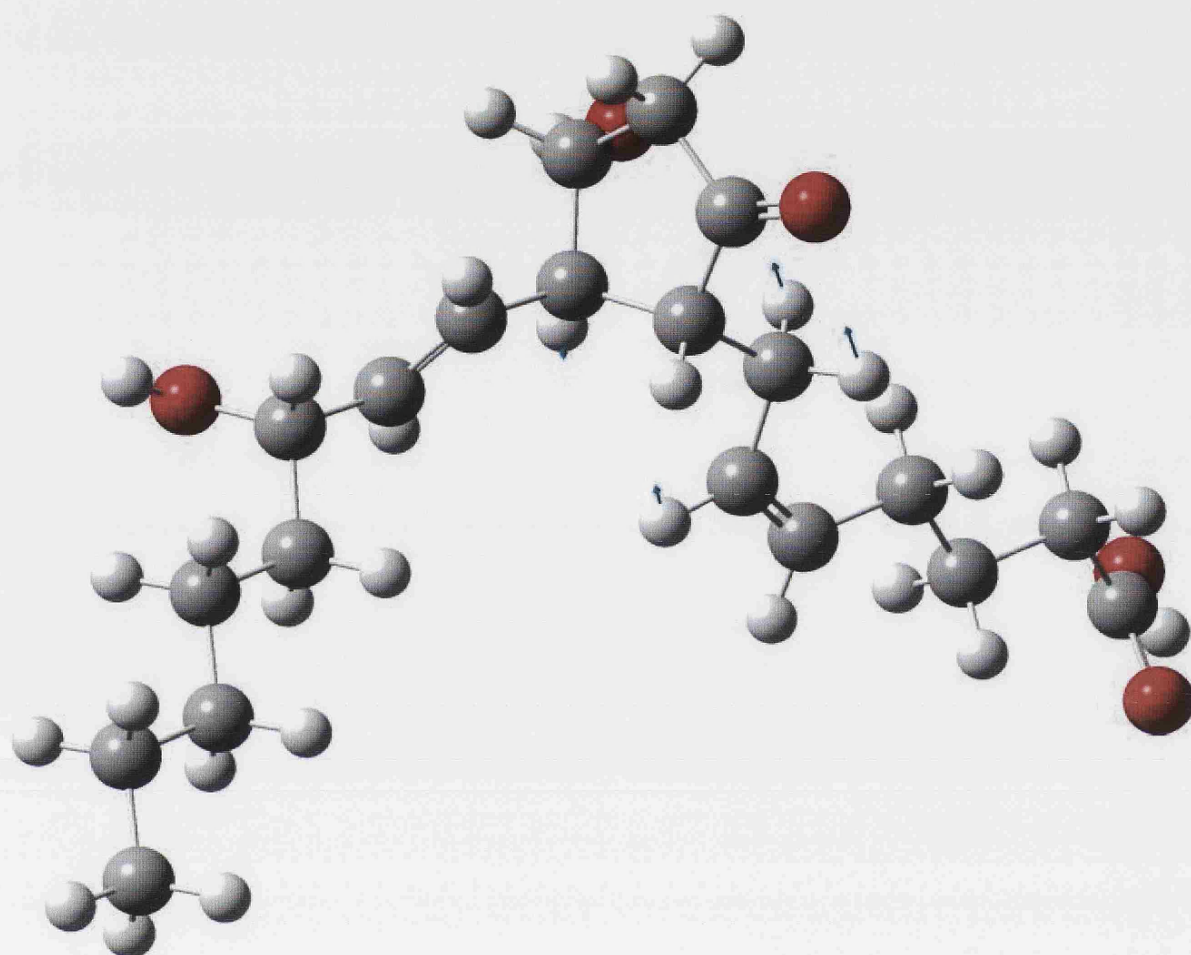
El objetivo principal de este estudio es analizar las diferencias celulares y moleculares existentes entre la bronquitis eosinofílica y el asma para, en un futuro, poder orientar el tratamiento hacia aquellos elementos diferenciales, consiguiendo así una mayor eficacia en la terapia de ambas patologías.

Para la consecución de este objetivo se proponen una serie de objetivos parciales que se detallan a continuación:

1. Caracterizar el componente celular inflamatorio a nivel sistémico (sangre periférica) y en el foco de la inflamación (esputo inducido).
2. Determinar el patrón de citocinas, factores y mediadores lipídicos implicados en el proceso inflamatorio, tanto a nivel génico como a nivel proteico en ambas patologías.
3. Evaluar las diferencias en la ruta enzimática de producción de la  $PGE_2$  a nivel génico, tanto en eosinófilos circulantes como en el esputo inducido y en biopsias bronquiales, así como el perfil de expresión cualitativo y cuantitativo de los receptores de dicha prostaglandina en asma y BE.
4. Analizar el efecto de la  $PGE_2$  en la reducción de la inflamación eosinofílica, mediante la determinación del proceso apoptótico en los eosinófilos de sangre periférica. Este objetivo se llevó a cabo a través de dos aproximaciones:
  - a. Efecto de la  $PGE_2$  endógena presente en el sobrenadante del esputo de los pacientes.
  - b. Efecto de la  $PGE_2$  sintética y agonistas de los receptores de esta prostaglandina.
5. Determinar el efecto ejercido por la  $PGE_2$  sobre el fenómeno de hiperplasia muscular a través de la evaluación de la proliferación de una línea de células musculares lisas bronquiales (CMLB), mediante dos aproximaciones:
  - a. Efecto de la  $PGE_2$  endógena presente en el sobrenadante del esputo de los pacientes.
  - b. Efecto de la  $PGE_2$  sintética, agonistas y antagonistas de los receptores de dicha prostaglandina.







### *3. Materiales y métodos*



### **3.1. SUJETOS DE ESTUDIO**

Los grupos de interés en este estudio son tres:

- Individuos sanos:  $n=13$ .
- Individuos con bronquitis eosinofílica:  $n=19$ .
- Individuos con asma:  $n=15$ .

Tanto los individuos diagnosticados de asma como los que padecen bronquitis eosinofílica fueron reclutados entre los pacientes que acuden al Servicio de Alergología de la Fundación Jiménez Díaz-Capio, Madrid.

Los individuos sanos o individuos control pertenecen al personal del Servicio de Alergología e Inmunología, Área de Investigación, así como estudiantes de la Escuela de Enfermería de la Fundación Jiménez Díaz-Capio, Madrid.

La obtención de muestras se realizó tras la firma del consentimiento informado por parte de los pacientes e individuos control, previa aprobación del proyecto por el Comité Ético de la Fundación Jiménez Díaz-Capio.

Este estudio es doble ciego. Las muestras se clasificaron con un código numérico de forma que la evaluación se realizó sin tener constancia del diagnóstico clínico hasta el momento del análisis de los datos.

#### **3.1.1. Grupos de estudio**

En el proceso de selección, tanto de los pacientes de asma y bronquitis eosinofílica (BE), como de los individuos que conforman el grupo control, se establecieron una serie de criterios para la inclusión o no en el estudio. Las características clínicas y demográficas de los individuos del estudio se muestran en la Tabla VIII del apartado 4.1.

##### **\* INDIVIDUOS CONTROL**

Los individuos control se reclutaron entre el personal de investigación, así como del Departamento de Alergología y la Escuela de Enfermería de la Fundación Jiménez Díaz-Capio.

Todos ellos son individuos no fumadores, sin historial de asma ni enfermedades alérgicas y/o bronquitis crónica, y que presentaban resultados negativos en las pruebas cutáneas frente a una batería de neumalérgenos habituales (pólenes, epitelios de animales, hongos ambientales y ácaros).

**\* INDIVIDUOS CON BRONQUITIS EOSINOFÍLICA**

Estos pacientes referían tos aislada desde al menos 8 semanas, no presentaban síntomas que sugirieran obstrucción variable al flujo aéreo, los valores espirométricos eran normales, el valor de PC<sub>20</sub> en la prueba de metacolina era superior a 16 mg/mL, radiografía normal de tórax y la eosinofilia en el esputo era superior a un 3%, cumpliendo así los criterios diagnósticos para esta patología<sup>[21]</sup>.

**\* INDIVIDUOS CON ASMA**

Los individuos que conforman el grupo de asma, presentaron un amplio historial y evidencias objetivas de padecer esta enfermedad (según definición de la American Thoracic Society). Estos pacientes mostraron una mejoría superior al 12% en el volumen espiratorio forzado durante los primeros 10 minutos tras la administración de 500 µg de terbutalina inhalada, teniendo una prueba de metacolina positiva (PC<sub>20</sub> inferior a 16 mg/mL), lo que implica hiperreactividad de las vías aéreas. Dichos sujetos presentaban un grado medio de gravedad de la enfermedad y eran clínicamente estables.

Se incluyeron en este grupo tanto pacientes atópicos como no atópicos, ya que previamente no se encontraron diferencias entre ambos grupos en aquellos parámetros objeto de análisis.

Tanto a los individuos con asma como a aquellos con bronquitis eosinofílica que estaban recibiendo tratamiento, se les retiraron los corticosteroides inhalados (CI) al menos dos semanas antes de la inducción del esputo. Ninguno de ellos recibió corticosteroides orales (durante al menos 6 meses antes del estudio), ni antagonistas de los receptores de leucotrienos, aspirina o cualquier inhibidor de la ciclooxigenasa.

Tras la firma del consentimiento informado, a todos los individuos del estudio se les extrajo tres tubos de sangre completa con un anticoagulante (EDTA), obteniéndose un volumen total de 27 mL, y uno sin anticoagulante, este último para la posterior obtención de suero (Vacutainer SST<sup>®</sup>BD S.A., Madrid, España).

**3.1.2. Determinación de la hiperrespuesta bronquial**

Una de las pruebas determinantes en el diagnóstico del asma es la prueba de hiperreactividad bronquial, en concreto, la prueba de provocación bronquial con metacolina la cual es una prueba no específica directa que, actualmente, es la mejor estandarizada y que

presenta un buen perfil de seguridad, por lo que es la más empleada. Por ello, fue la prueba de elección para evaluar la existencia o no de hiperreactividad bronquial, criterio que forma parte del diagnóstico diferencial entre asma y bronquitis eosinofílica.

## **3.2. ESPUTO INDUCIDO**

### **3.2.1. Obtención de la muestra de esputo inducido**

La muestra se obtiene a través de la inducción con concentraciones crecientes de suero salino hipertónico (entre 3-5%)<sup>[154]</sup>, con un nebulizador ultrasónico Pulmo-Aide (DeVilbiss, Illinois, Estados Unidos). La expectoración suele conseguirse con concentraciones intermedias, recogiendo en un recipiente estéril.

### **3.2.2. Procesamiento del esputo inducido**

El procesamiento ha de hacerse en el menor tiempo posible pues este tipo de muestra es bastante lábil, siendo el porcentaje de viabilidad uno de los criterios de aceptación o rechazo de este tipo de muestra. Se realizó dentro de las dos horas siguientes a su recogida, manteniendo la muestra a una temperatura baja (aproximadamente unos 4°C), lo que evita, en parte, la muerte celular y la consiguiente pérdida de viabilidad.

Dada la gran cantidad de mucosidad que en ocasiones contiene, este tipo de muestra ha de recibir un tratamiento previo para posibilitar su uso en los diversos análisis que se llevan a cabo posteriormente. El protocolo que se ha usado, descrito previamente por Hadjicharalambous y colaboradores<sup>[155]</sup>, fue ligeramente modificado. Se registra el volumen de esputo obtenido y se añade un volumen igual de ditriotreitol (DTT, Sigma-Aldrich, MO, Estados Unidos) diluido al 0,1% en tampón fosfato salino PBS Dulbecco (Gibco, Invitrogen Corporation, Nueva York, Estados Unidos), utilizando un agitador para conseguir una buena homogeneización. Se incubó la muestra en un agitador húmedo a 37°C y 180 r.p.m. durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo establecido, se añade el mismo volumen anteriormente utilizado de PBS Dulbecco para inhibir la acción del DTT que, mantenido durante un tiempo excesivo, puede tener propiedades tóxicas para las células.

Para eliminar el moco de la muestra, se emplea un filtro de 40 µm de nailon (BD Falcon, Bélgica). Una vez filtrada, la muestra se centrifuga a 754 g durante 10 minutos a 4°C, lo que nos permite separar la fase sólida o sedimento celular, de la fase líquida o sobrenadante.

El sobrenadante se alicuota y se almacena a -80°C hasta su posterior uso (en análisis proteicos y lipídicos).

En cuanto a la fase sólida, se resuspende en 2 mL de PBS/albúmina de suero bovino (BSA) 0,1%/EDTA 0,1M (Sigma-Aldrich, MO, Estados Unidos) y se procede a un recuento total de la celularidad en una cámara Neubauer, evaluando la viabilidad y el porcentaje de células escamosas (contaminación). Tanto la viabilidad como el porcentaje de contaminación del esputo son parámetros fundamentales en los criterios de aceptación o rechazo de la muestra<sup>[156]</sup>. Actualmente, están estandarizados como criterios de aceptación una viabilidad superior al 50% y un porcentaje de contaminación inferior al 20%. Sin embargo, en este trabajo, se han adoptado criterios más severos, teniendo que superar la muestra un 80% de viabilidad y poseer un porcentaje de células escamosas inferior al 10-12% para considerarla una muestra válida. Sólo si tras su procesamiento la muestra de esputo cumplió ambos criterios, es incluida en el estudio.

Para poder realizar la evaluación microscópica, se utiliza como tinción el colorante vital Azul Tripan (Gibco, Invitrogen Corporation, Nueva York, Estados Unidos) con una dilución 1:1 (10 µL de la muestra + 10 µL del colorante), realizándose el recuento en un microscopio óptico (Modelo Labophot-2, Nikon, Japón). Este colorante permite determinar la viabilidad celular; así, las células muertas se tiñen de azul ya que, al estar alterada la permeabilidad de la membrana plasmática, ésta permite la entrada del colorante al interior celular.

Tras el recuento, se deja la muestra a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL. Parte del sedimento celular se utiliza para el análisis por citometría de flujo, mientras que el resto se congela en 800 µL de Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen, CA, Estados Unidos) para el desarrollo de posteriores análisis génicos.

### **3.3. ANÁLISIS DE LAS SUBPOBLACIONES CELULARES EN SANGRE PERIFÉRICA Y EN ESPUTO INDUCIDO**

#### **3.3.1. Preparación de la sangre periférica para citometría de flujo**

En el estudio del patrón celular se analiza la expresión de los marcadores específicos de superficie de las distintas poblaciones celulares mediante la técnica de inmunofluorescencia directa, usando un citómetro de flujo modelo FACSCalibur (Becton Dickinson, Bélgica). En este caso, la muestra de partida es la sangre periférica extraída con un anticoagulante. Dado que el modelo de citómetro empleado sólo permite usar tres fluorocromos simultáneos, se estableció el

panel de citometría, el cual comprende diversas combinaciones de anticuerpos para poder evaluar todos los tipos celulares de interés.

Los anticuerpos específicos utilizados para la sangre periférica han sido los siguientes:

- Eosinófilos: CCR3 (receptor de eotaxina; RD Systems, Minneapolis, Estados Unidos).
- Neutrófilos: CD16 (BD Biosciences, San José, CA, Estados Unidos).
- Linfocitos: CD4/CD2/CD8/CD19 (BD Biosciences, San José, CA, Estados Unidos).
- Monocitos: CD14/HLA-DR (BD Biosciences, San José, CA, Estados Unidos; Cytognos, Salamanca, España).
- Precursores eosinofílicos: CD34/CDw125 (este último corresponde a la cadena  $\alpha$  del receptor de la IL-5; BD Biosciences, San José, CA, Estados Unidos).
- Basófilos activados: CD63/IgE (BD Biosciences, San José, CA, Estados Unidos; Vector Laboratories, Burlingame, CA, Estados Unidos).
- Activación general: CD69, CD25, HLA-DR (BD Biosciences, San José, CA, Estados Unidos para CD69 y CD25; Cytognos, Salamanca, España para HLA-DR).

Los anticuerpos (Ac) pueden ir marcados con tres fluorocromos diferentes: fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) o ficoeritrina-Cy5 (PE-Cy5). En función de esto, se establece el panel concreto de citometría<sup>[157]</sup>.

A 100  $\mu$ L de sangre periférica se añaden 3  $\mu$ L de cada uno de los anticuerpos correspondientes, en función del subtipo celular que queramos determinar. Se incuban en oscuridad durante 30 minutos. A continuación, se añade 1 mL de solución de lisis (BD Biosciences, San José, CA, Estados Unidos), se incuba durante 10 minutos y se centrifuga los tubos a 754 g durante 5 minutos y a 4°C.

Se decanta el sobrenadante, se resuspende el sedimento despegándolo mecánicamente y se lava con 2 mL de FACSFlow™ (BD Biosciences, San José, CA, Estados Unidos), solución comercial recomendada para el lavado de las células, centrifugándolo a 754 g durante 7 minutos a 4°C.

Finalmente, se decanta de nuevo y se resuspende el pellet celular en 500  $\mu$ L de FACSFlow™.

Las muestras se evalúan por citometría de flujo, analizándose un total de  $10^4$  células.

### **3.3.2. Preparación del esputo inducido para citometría de flujo**

Con el fin de obtener una visión panorámica de las subpoblaciones celulares predominantes en el foco inflamatorio, parte del esputo inducido procesado se utiliza para el análisis de dicha celularidad mediante citometría de flujo.

El panel de citometría utilizado en el caso del esputo es el mismo que el utilizado en la sangre periférica, con la salvedad de que en todos los tubos se añade el anticuerpo frente a CD45 (marcador panleucocitario)<sup>[158]</sup>, lo que facilita la discriminación de las células de interés. Dicho marcaje de membrana va unido al fluorocromo PE-Cy5 (tercer canal de fluorescencia).

A un total de  $10^5$  células por alícuota, se le añaden 3  $\mu\text{L}$  de cada uno de los anticuerpos adecuados, incubándose el esputo durante 30 minutos en oscuridad y a  $4^\circ\text{C}$ .

A continuación, se hace un lavado con 1,5 mL de PBS/2% suero de ternera fetal inactivado (STFi, Gibco Invitrogen Corporation, Nueva York, Estados Unidos), resuspendiéndolo en un volumen final de 400  $\mu\text{L}$  de FACSFlow<sup>TM</sup>. Se analizan  $10^4$  células dentro de la región de interés.

## **3.4. PURIFICACIÓN DE EOSINÓFILOS DE SANGRE PERIFÉRICA**

Todo el proceso de purificación se lleva a cabo en una campana de flujo laminar (Cultek, Madrid, España).

La purificación se realiza a partir de 18 mL de sangre periférica extraída con EDTA. Se mezcla con un volumen igual de suero salino al 0,9% en un tubo estéril de 50 mL. Una vez homogeneizado, se realiza un gradiente de densidad con solución de aislamiento de linfocitos (Linfoprep, Comercial Rafer, Zaragoza, España) siguiendo una proporción 3:5 de sangre y Linfoprep. Se centrifuga a 456 g durante 20-25 minutos y sin freno. Esta centrifugación nos permite obtener distintas fases claramente diferenciadas.

En la parte superior se sitúa el plasma, separado del medio utilizado para generar el gradiente por un aro blanquecino correspondiente a las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, peripheral blood mononuclear cells). En el sedimento se observa una fase que contiene toda la serie roja (eritrocitos, plaquetas) y los granulocitos.

Se separa el plasma y se alicuota, almacenándolo a  $-80^\circ\text{C}$ .

Se recoge la franja que comprende las células mononucleares y, tras dos lavados con suero salino isotónico (0,9%), se centrifuga a 673 g durante 7-10 minutos. Las PBMCs purificadas se dividen en dos partes: una de ellas se almacena en 3 viales con 1,5 mL de medio de congelación



que contiene RPMI 1640 (Lonza, Verviers, Bélgica) completo, es decir, con penicilina y estreptomicina al 1%, piruvato sódico al 1%, glutamina al 1% (Lonza, Verviers, Bélgica) y STFi al 10% con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich, MO, Estados Unidos) para posibles estudios posteriores, y la otra se congela en 1 mL de Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen, CA, Estados Unidos) para estudios génicos.

Los eritrocitos y granulocitos que se sitúan en la parte inferior tras la centrifugación, también se lavan para eliminar los restos del Linfoprep. En este caso, los lavados se llevan a cabo con medio RPMI 1640 completo centrifugándolo, al igual que las PBMCs, a 673 g durante 7-10 minutos.

El sedimento celular obtenido de color rojizo se resuspende hasta un volumen de 35 mL con suero salino isotónico, se añaden 5 mL de dextrano al 6,5% p/v, y se incuba durante 20 minutos a 37°C. Con este paso, se consigue la precipitación de la mayoría de los eritrocitos, mientras que los granulocitos se mantienen en suspensión.

Transcurrido este tiempo, se recoge el sobrenadante, lavándolo 2 veces con medio completo, y en el último se recoge el sedimento celular.

Como último paso para eliminar los eritrocitos que todavía podría contener la muestra, se incuba 2-3 minutos con 50 mL de solución de lisis (NH<sub>4</sub>Cl 0,15 M, KHCO<sub>3</sub> 0,01 M y EDTA 0,05 mM, todo ello en agua bidestilada) y se centrifuga a 754 g durante 5 minutos a 4°C. De esta forma, se lisan los eritrocitos restantes, obteniéndose un sedimento de color blanco.

Dicho sedimento se lava dos veces con el medio más adecuado para la posterior selección magnética, el cual contiene PBS, STFi 2% y EDTA 1 mM.

Así, tras estos pasos, se obtienen los granulocitos de la muestra de sangre periférica. A continuación, se realiza un recuento total en una cámara Neubauer, dejándose a una concentración de  $50 \times 10^6$  células/mL.

A partir de estos granulocitos se purifican los eosinófilos mediante el kit EasySep Human Eosinophil Enrichment kit<sup>®</sup> (StemCell Technologies, Estados Unidos), basado en una selección magnética negativa de dicha población celular. Este kit se fundamenta en el uso de un cocktail de anticuerpos: CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD36, CD123 y glicoforina A. Estos anticuerpos están unidos directamente a unos complejos tetraméricos (TAC), los cuales se adhieren de forma específica a las células correspondientes que serán eliminadas por selección positiva mediante el uso de unas nanopartículas magnéticas. Dichas nanopartículas se retiran con un imán (Figura 16). Los eosinófilos, al no quedar unidos a los complejos tetraméricos y, por tanto, no quedar pegados a las nanopartículas magnéticas, quedarán en el sobrenadante. El

volumen de anticuerpos, así como de las esferas magnéticas que hay que añadir a las células, se calcula siguiendo las recomendaciones del kit comercial.

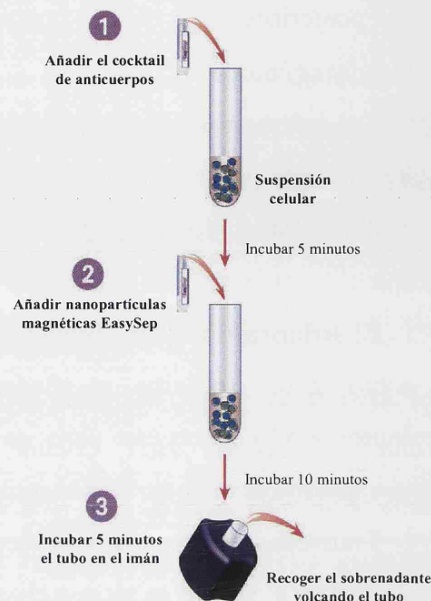
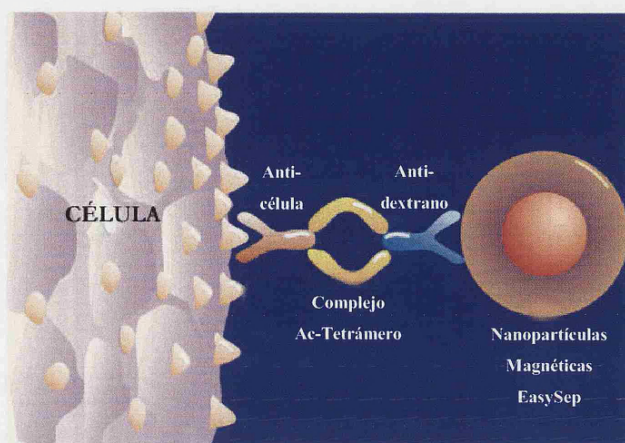


Figura 16. Esquema del protocolo de purificación de eosinófilos por selección negativa mediante el uso de nanopartículas magnéticas (modificado del protocolo proporcionado con el producto por EasySep, StemCell).

La muestra de granulocitos (a una concentración de  $50 \times 10^6$  células/mL) se incuba con el volumen correspondiente del cocktail de anticuerpos durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añaden las esferas magnéticas y tras una incubación de iguales características que la anterior, se coloca el tubo con la muestra en un imán durante 5 minutos.

Se recoge el sobrenadante por decantación y se cuantifica el número de eosinófilos en una cámara Fuchs-Rosenthal, mezclando 100  $\mu\text{L}$  de la tinción utilizada para eosinófilos (0,05% azul de toluidina, 0,85% cloruro sódico, etanol 95%, saponina saturada en etanol 50%) con 10  $\mu\text{L}$  de la muestra.

Si el número de eosinófilos es lo suficientemente elevado (a partir de  $5 \times 10^6$  eosinófilos totales), parte se congelan en Trizol<sup>®</sup> (1 mL por cada  $1 \times 10^6$  células) para la extracción del ARN y, el resto, en medio de congelación (1,5 mL por vial).

### **3.5. EVALUACIÓN DE LA IgE TOTAL**

Con el fin de evaluar parte de la posible respuesta humoral en ambas patologías, se analizaron los niveles de IgE en el suero de todos los sujetos del estudio. Para ello, se realizó la determinación de IgE total por ImmunoCap<sup>®</sup> empleando el autoanalizador CAP250 (Phadia Suecia).

### **3.6. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CITOCINAS EN EL FOCO INFLAMATORIO (ESPUTO INDUCIDO) POR PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL**

#### **3.6.1. Extracción del ARN**

La extracción del ARN se lleva a cabo a partir del sedimento celular, resuspendido en Trizol<sup>®</sup> y obtenido tras el procesamiento del esputo inducido.

Como se describe en el protocolo comercial del Trizol<sup>®</sup> de Invitrogen, se incuba el homogeneizado celular durante 5 minutos a temperatura ambiente para conseguir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. A continuación, se añaden 200 µL de cloroformo (Sigma-Aldrich, MO, Estados Unidos) por cada mL de Trizol<sup>®</sup> y se agita vigorosamente de forma manual, incubándose a temperatura ambiente durante 2-3 minutos. Se centrifugan las muestras a 12000 g durante 15 minutos a 4°C en una microfuga Mikro 24-48 (Hettich AG, Tuttlingen, Alemania). Tras esta centrifugación, se observan tres fases claramente diferenciadas en la muestra:

- Fase fenol-cloroformo. En ella se localizan las proteínas.
- Interfase.
- Fase superior. Fase acuosa en la cual se encuentra el ARN.

Tras pasar esa fase acuosa a un nuevo tubo, se añaden 500 µL de isopropanol por mL de Trizol<sup>®</sup> para conseguir la precipitación del ácido nucleico. Las muestras se incuban durante 10 minutos a temperatura ambiente y, a continuación, se centrifugan en frío a 12000 g durante 10 minutos. Se decanta el sobrenadante y se lava el sedimento con 1 mL de etanol (por mL de Trizol<sup>®</sup>) al 75% mediante una centrifugación a 7500 g a 4°C durante 5 minutos.

Se elimina el sobrenadante por decantación o con una pipeta y se deja secar el sedimento de ARN durante 7-10 minutos. Por último, se resuspende dicho sedimento en 40 µL de agua libre de RNasas y se procede a su cuantificación midiendo las absorbancias a 260 nm y 280 nm en

un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Bonsai Technologies Group S.A., Madrid, España) obteniendo, además de la concentración a la que se encuentra el ARN de cada muestra, la relación entre las dos absorbancias, lo que permite conocer el grado de pureza del ácido nucleico.

### **3.6.2. Síntesis del ADN complementario (ADNc)**

La síntesis del ADN complementario se realiza a partir de 1 µg del ARN de cada muestra. Para este proceso se usa el kit High Capacity cDNA<sup>®</sup> (Applied Biosystems, CT, Estados Unidos).

Siguiendo el protocolo comercial de Applied Biosystems, se prepara una reacción cuyo volumen final es de 45 µL, de los cuales, 25 µL corresponden a la mezcla base de la reacción y los 20 µL restantes corresponden al ácido nucleico.

La mezcla de reacción está compuesta por:

- 5 µL de tampón 10X.
- 2 µL de dNTPs 100 mM.
- 5 µL de *Random primers* o cebadores 10X.
- 2,5 µL de la retrotranscriptasa MultiScript (50 U/µL).
- 10,5 µL de agua libre de nucleasas (Applied Biosystems, CT, Estados Unidos).

A estos 25 µL de mezcla de reacción se añade el volumen de la muestra que corresponde, en función de su concentración, a 1 µg de ARN, completando con agua libre de RNasas hasta 20 µL y constituyendo un volumen final de 45 µL.

La reacción de retrotranscripción (paso de ARN a ADNc) se lleva a cabo en un termociclador modelo 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, CT, Estados Unidos) y consta de los siguientes pasos: 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C y 5 segundos a 85°C.

### **3.6.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) Cuantitativa a Tiempo Real (qRT-PCR)**

Esta técnica nos permite conocer el nivel de expresión de un gen concreto, en un determinado tipo de muestra, en cada uno de los individuos o sujetos del estudio. En este caso, la muestra de estudio es el sedimento celular obtenido en el procesamiento del esputo inducido, el cual procede de la zona más próxima a la zona de inflamación, y por tanto, la de mayor interés en este estudio.

La PCR cuantitativa se realiza en un sistema de PCR a Tiempo Real modelo 7500 (Applied Biosystems, CT, Estados Unidos).

El volumen final de la reacción por cada punto de la placa es de 10  $\mu$ L, de los cuales 9,5  $\mu$ L son una mezcla de la enzima y los reactivos que ésta requiere (TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems, CT, Estados Unidos) y 0,5  $\mu$ L del ADNc. Se realiza un análisis de tipo Single Plex con el marcaje en FAM. Cada análisis de muestra y gen se realiza por triplicado.

Las condiciones de la PCR llevada a cabo son: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C y 40 ciclos con dos temperaturas, 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C.

Se usan sondas comerciales específicas de los genes de IL-5, IL-10, IL-13, IL-4, TGF $\beta$ 1, IFN $\gamma$  y VEGF (Tabla V). Como control endógeno, se usa el gen del ARN ribosomal 18s dado que, aunque existen otros genes válidos como endógenos pues se expresan de forma constitutiva en todas las células, se comprobó que el del ARN ribosomal era el que presentaba una mayor homogeneidad de expresión en nuestra muestra de interés, el esputo.

Gen	Ref. comercial "Assays on Demand"	Código del "Gene Bank"	Long. del fragm. amplif (pb)	Cr
IL-5	Hs01548712_g1	NM_000879.2	99	5
IL-10	Hs00961619_m1	NM_000572.2	98	1
IL-13	Hs01124271_g1	NM_002188.2	70	5
IL-4	Hs00174122_m1	NM_172348.1 NM_000589.2	70	5
VEGF	Hs00900054_m1	NM_001025366-70.1 NM_001033756.1 NM_003376.4	60	6
TGF- $\beta$	Hs99999918_m1	NM_000660.3	125	19
IFN- $\gamma$	Hs00174143_m1	NM_000619.2	79	12
ARNr 18s	Hs99999901_s1	X03205.1	187	

Tabla V. "Primers" o sondas específicas de los genes de diversas citocinas y factores evaluados mediante PCR Cuantitativa a Tiempo Real. Estos genes han sido evaluados en la muestra de esputo inducido con el fin de determinar el patrón inflamatorio de citocinas característico de cada patología estudiada.

Los resultados se presentan como la relación entre el nivel de expresión de cada gen problema y el del gen endógeno (que actúa como control, expresión 3) en cada muestra de esputo de cada uno de los pacientes de estudio. Finalmente, los datos se expresan de forma normalizada mediante la siguiente fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} \quad [1]$$

donde

$$\Delta\Delta Ct = [\Delta Ct_{(pacientes)}] - [\Delta Ct_{(control sano)}] \quad [2]$$

y

$$\Delta Ct = [Ct_{(gen)}] - [Ct_{(18s)}] \quad [3]$$

siendo Ct el ciclo en el que la expresión del gen comienza a ser exponencial. Los valores empleados en el cálculo de la expresión 2 son las medias de cada grupo obtenidas a partir de los valores individuales calculados con la expresión 3.

### 3.7. ANÁLISIS A NIVEL PROTEICO DE DIVERSAS CITOCINAS, FACTORES Y MEDIADORES LIPÍDICOS EN EL SOBRENADANTE DEL ESPUTO INDUCIDO

De forma paralela al análisis génico de numerosas citocinas en el sedimento celular del esputo por PCR Cuantitativa a Tiempo Real, también se han cuantificado a nivel proteico diversas citocinas y factores en el sobrenadante del esputo mediante la técnica denominada EIA (enzimoinmuno análisis) en fase sólida.

Se han realizado ensayos para cuantificar: IL-5, IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-8, TNF- $\alpha$  y VEGF (Bender MedSystems, Viena, Austria), así como mediadores lipídicos, prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) y cisteinil-leucotrienos (Cys-LTs), concretamente el leucotrieno C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, Estados Unidos).

En el caso de la determinación de las citocinas y factores pro-inflamatorios, se siguió el protocolo suministrado en cada kit por la casa comercial (Bender MedSystems, Viena, Austria).

Se utiliza una placa comercial de 96 pocillos tapizada con un anticuerpo específico frente a la proteína que se desea detectar en cada caso. Se comienza lavando la placa dos veces con PBS/ Tween-20<sup>®</sup> 1% y, a continuación, se añade en los pocillos correspondientes 100  $\mu$ L de los sobrenadantes de los esputos de los pacientes y sujetos sanos del estudio diluidos 1/2 en el diluyente comercial, así como diluciones seriadas (1/2) de la proteína estándar, cuya concentración inicial es 2000 pg/mL en el caso de VEGF, 1000 pg/mL para IL-8, 500 pg/mL en el ensayo de IL-5 y TNF- $\alpha$ , 200 pg/mL para IL-10 y 100 pg/mL para IFN- $\gamma$ . Seguidamente, a todos los

pocillos se añaden 50  $\mu\text{L}$  del anticuerpo de captura marcado con biotina y se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación (200 g). Transcurrido este tiempo, se lava la placa tres veces con PBS/Tween-20<sup>®</sup> al 1% y se añaden 100  $\mu\text{L}$  de la enzima estreptavidina-peroxidasa (HRP), incubándose la placa durante una hora en las mismas condiciones previamente mencionadas.

Se lava y se añaden 100  $\mu\text{L}$  del sustrato tetrametilbencidina (TMB) y peróxido de hidrógeno al 0,02% incubando durante 10 minutos, a temperatura ambiente, en agitación y en condiciones de oscuridad. Se detiene la reacción añadiendo 100  $\mu\text{L}$  de la solución de stop y se lee a una absorbancia de 450 nm en un lector de placa modelo Anthos 2020 (Anthos Labtec Instruments, Cambridge, Reino Unido).

Finalmente, se construye una curva patrón con las concentraciones estándar conocidas de la proteína de estudio, interpolándose en dicha curva los valores de absorbancia de los sobrenadantes de los pacientes.

Los resultados se expresan como picogramos (pg)/mL o nanogramos (ng)/mL.

En el caso de los ensayos de los mediadores lipídicos se siguen las indicaciones del kit comercial, añadiéndose simultáneamente todos los componentes así como las muestras de sobrenadante del esputo o la curva estándar, según corresponda en cada pocillo, y se incuba la placa durante 18 h a temperatura ambiente.

Transcurrida esta incubación, se lava la placa y se añaden 200  $\mu\text{L}$  del reactivo de Ellman, dejándolo a temperatura ambiente durante 60-90 minutos. La lectura de la absorbancia se realiza a una longitud de onda de 420 nm.

### **3.8. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS ENZIMAS IMPLICADAS EN LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE LA $\text{PGE}_2$**

Para evaluar los niveles de expresión de las enzimas implicadas en la ruta de producción de la  $\text{PGE}_2$  o vinculadas a ella por ser las productoras de su precursor (ácido araquidónico), se ha utilizado la técnica de PCR Cuantitativa a Tiempo Real, empleando como materia prima el ADNc de los eosinófilos de sangre periférica, del sedimento celular del esputo así como de biopsias bronquiales. Las enzimas implicadas en la ruta de la  $\text{PGE}_2$  analizadas son: ciclooxigenasa

(COX)-1, COX-2, 15-hidroxiprostaglandina dehidrogenasa (15-PGDH), prostaglandina-E sintasa (PGES), y dos fosfolipasas, la cPLA<sub>2</sub> (citósólica) y la sPLA<sub>2</sub> (secretada) (Tabla VI).

Gen	Ref. comercial "Assays on Demand"	Código del "Gene Bank"	Long. del fragm. amplif (pb)	Cr
COX-1	Hs00277289_s1	NM_080591.1 NM_000962.2	60	9
COX-2	Hs00153133_m1	NM_000963.1	75	1
15-PGDH	Hs00168359_m1	NM_000860.3	61	4
PGES	Hs00610420_m1	NM_004878.3	68	9
s-PLA <sub>2</sub> -X	Hs00358567_m1	NM_003561.1	67	16
c-PLA <sub>2</sub>	Hs00931531_g1	NM_182709.1 NM_182710.1 NM_006388.2	92	11

Tabla VI. Sondas específicas de las enzimas implicadas en la ruta de producción de la PGE<sub>2</sub>, así como fosfolipasas vinculadas a la liberación del ácido araquidónico (precursor de la PGE<sub>2</sub>).

La extracción del ARN y posterior síntesis del ADN complementario se ha explicado con anterioridad en los apartados 3.6.1 y 3.6.2. En el caso de las biopsias bronquiales, las muestras se trituraron en un homogeneizador Micra D-1 (Labortechnik, Alemania) y, tras resuspender el homogeneizado en 1 mL de Trizol<sup>®</sup>, se han seguido los protocolos anteriormente descritos.

### 3.9. EVALUACIÓN DE LOS RECEPTORES DE LA PGE<sub>2</sub>

Dado que los efectos de la PGE<sub>2</sub> se deben, en parte, al receptor a través del cual actúe, se decidió estudiar la presencia de los receptores de la PGE<sub>2</sub>. Así, se han analizado todos los receptores a nivel génico en eosinófilos circulantes, esputo y biopsias bronquiales, y sólo EP2 y EP4, a nivel proteico, en los eosinófilos de sangre periférica.

#### 3.9.1. Evaluación génica de los receptores de la PGE<sub>2</sub>

A nivel génico, la determinación se lleva a cabo mediante PCR Cuantitativa, metodología descrita en el apartado 3.6.3, con sondas específicas para los receptores (Tabla VII), tanto en los eosinófilos purificados de sangre periférica, como en el sedimento celular del esputo así como en las muestras de biopsias bronquiales.



Gen	Ref. comercial “Assays on Demand”	Código del “Gene Bank”	Long. del fragm. amplif (pb)	Cr
EP1	Hs00168752_m1	NM_000955.2	75	19
EP2	Hs00168754_m1	NM_000956.2	79	14
EP3	Hs00167855_m1	NM_000957.2	121	1
EP4	Hs00168761_m1	NM_000958.2	68	5

Tabla VII. Sondas específicas de los receptores de la PGE<sub>2</sub>.

### 3.9.2. Evaluación proteica de los receptores de la PGE<sub>2</sub>

A nivel proteico, se han desarrollado diversas técnicas: citometría de flujo (evaluación cuantitativa) y microscopía confocal (evaluación cualitativa), empleando en ambos casos los eosinófilos de sangre periférica.

#### 3.9.2.1. MICROSCOPIA CONFOCAL

Tras la purificación de los eosinófilos, se resuspenden  $2 \times 10^6$  células en 500  $\mu\text{L}$  de Azul de Evans/EDTA 1 mM (para eliminar la autofluorescencia del eosinófilo) incubándose durante 30 minutos a 4°C y en movimiento (evitando así la agregación de las células).

A continuación, se centrifugan a 80 g durante 5 minutos a 4°C, se elimina el sobrenadante y se resuspenden en 500  $\mu\text{L}$  de RPMI 1640/BSA 0,5%/EDTA 1 mM. Este medio es el que se utiliza a lo largo de todo el protocolo.

Se añaden los anticuerpos frente a EP2 y EP4 por separado (IgG de conejo, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, Estados Unidos), a una dilución final 1/10, incubándose en agitación durante 1 h a 4°C. Se lava 2 veces y se desecha el sobrenadante. Tras resuspender en 100  $\mu\text{L}$  del medio previamente mencionado se añade, a una dilución final 1/50, el anticuerpo secundario (suero de cabra anti-IgG de conejo) marcado en Texas Red. Se incuba en oscuridad durante 1 h, a 4°C y en movimiento.

Transcurrida esta segunda incubación y después de sus correspondientes lavados, se elimina el sobrenadante con pipeta y se resuspende en 30  $\mu\text{L}$  de FluorSave™ Reagent (Calbiochem, La Jolla, CA, Estados Unidos). Una vez que el sedimento celular está completamente disgregado, se dispensan 3  $\mu\text{L}$  sobre un portaobjetos, cubriéndolos con cubreobjetos redondos de 12 mm (Kemia Científica, Madrid, España).

Se dejan toda la noche a 4°C para que las células queden bien fijadas al portaobjetos.

Para ver el patrón de expresión se utiliza un microscopio confocal (TCS SP5, Leica Microsystems, Alemania).

### 3.9.2.2. CITOMETRÍA DE FLUJO

En esta determinación se utilizan parte de los eosinófilos purificados de sangre periférica de los pacientes del estudio.

Tras su aislamiento (apartado 3.4), se alicuotan  $1 \times 10^5$  células/tubo utilizándose cuatro en cada ensayo:

- \* Control isotípico: IgG1 $\gamma$ /IgG2a/CD45 (BD Biosciences, San José, CA, Estados Unidos).
- \* CCR3 /VLA-4 /CD45 (RD Systems, Minneapolis, Estados Unidos; Beckman Coulter, Fullerton, CA, Estados Unidos; Cytognos, Salamanca, España).
- \* EP2/VLA-4/CD45 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, Estados Unidos).
- \* EP4/VLA-4/CD45 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, Estados Unidos).

La mezcla de eosinófilos se incuba durante 30 minutos con 5  $\mu$ L de cada anticuerpo. Dado que estos anticuerpos específicos para los dos tipos de receptores no están marcados con fluorocromos, se realiza una segunda incubación de 30 minutos con 5  $\mu$ L de un anticuerpo hecho en cabra frente a IgG de conejo unido a fluoresceína (Santa Cruz Biotechnology, CA, Estados Unidos). Tras esta segunda incubación, se lavan con 2 mL de PBS a 713 g durante 5 minutos. Se decanta el sobrenadante, resuspendiéndose el sedimento en 400  $\mu$ L de FACSFlow™, pasando a realizar la adquisición y el análisis en el citómetro de flujo.

## **3.10. EVALUACIÓN DE LA APOPTOSIS DE EOSINÓFILOS DE SANGRE PERIFÉRICA**

La apoptosis se evalúa mediante la técnica de citometría de flujo con el kit rh Annexin V/FITC® (Bender MedSystems, Viena, Austria), siguiendo el protocolo de dicho kit comercial. Este protocolo se basa en la presencia o ausencia de fosfatidil-serina (PS) en la superficie celular y el marcaje con yoduro de propidio (PI). Cuando la célula entra en apoptosis, los componentes de la membrana sufren una serie de reorganizaciones entre las que se encuentra la expresión de la PS

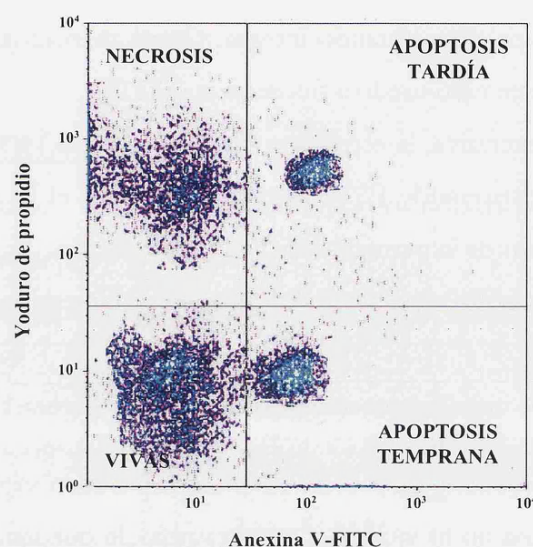
en superficie, pues hasta ese momento se encontraba en una ubicación citoplasmática. En este estadio del proceso, la membrana sigue estando íntegra. Como marcador de la PS se emplea la anexina-V, ligando natural, en este caso unido a fluoresceína (FITC).

En esa progresión degenerativa, la estructura de la membrana va siendo más porosa por lo que, con el tiempo, seguirá expresando PS en la membrana pero el PI será capaz de entrar al interior celular debido al aumento de la permeabilidad de la membrana.

En un último estadio, la PS es liberada al medio y la membrana está prácticamente desintegrada.

De esta forma, podemos visualizar cuatro fases diferentes (Figura 17):

- Vivas. Marcaje doble negativo. La PS no se expresa en superficie celular debido a que la membrana no ha sufrido ningún cambio, lo que también impide la entrada del PI al interior de la célula.
- Apoptosis temprana. Marcaje simple positivo para la anexina-V. La célula ya ha entrado en el proceso de apoptosis puesto que la PS se expresa en la superficie celular, aunque la membrana mantiene todavía su integridad pues el PI no es capaz de penetrar en el citoplasma.
- Apoptosis tardía. Doble marcaje positivo para la anexina-V y el PI. La célula no ha muerto ya que la PS todavía permanece anclada a la membrana, pero ya ha sufrido alteraciones estructurales puesto que el PI ha entrado al interior celular.
- Necrosis. Marcaje simple positivo para el PI. La célula está totalmente muerta pues la PS ya se ha desprendido de la membrana debido a la alteración o destrucción de ésta.



**Figura 17.** Esquema representativo de una imagen (*dot plot*) de citometría de flujo de los ensayos de apoptosis. La imagen representa las cuatro fases en las que se pueden encontrar: las células vivas, apoptosis temprana, apoptosis tardía o necrosis.

Tras diseñar las condiciones de los ensayos y preparar las placas de cultivo, los eosinófilos se incuban en una estufa (modelo 3111, Forma Scientific, Inc, CA, Estados Unidos) a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub> durante 18 - 24h.

Transcurrido este tiempo, se recoge el volumen necesario para tener una concentración entre  $1 \times 10^5$  y  $5 \times 10^5$  células/100  $\mu$ L. Dicho volumen se lava dos veces con PBS frío 0,5 M a 673 g durante 5 minutos. Tras decantar el sobrenadante del segundo lavado y despegar las células, se resuspenden en 195  $\mu$ L del tampón de unión del kit. A continuación, se añaden 5  $\mu$ L de anexina-V unida a FITC en cada uno de los tubos incubándolos, tras agitarlos, durante 15 minutos en frío y en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se lavan las células con PBS frío 0,5 M y se centrifugan a 673 g durante 5 minutos. Se decanta el sobrenadante y se resuspende en 190  $\mu$ L del tampón de unión. Inmediatamente, se añaden 10  $\mu$ L de PI, analizándose las muestras en el citómetro de flujo.

En todos los ensayos se utiliza una curva para calibrar y compensar las fluorescencias. Dicha curva se establece con células del mismo tipo que las del ensayo, utilizándose 4 tubos diferentes:

- Tubo A: sin ningún marcaje.
- Tubo B: con anexina-V-FITC, para ajustar la fluorescencia del primer color.
- Tubo C: con PI, para ajustar la fluorescencia del segundo color o canal de fluorescencia.
- Tubo D: doble marcaje, para compensar las fluorescencias anteriores.

Se analizan un total de 5000 células por tubo.

### **3.10.1. Efectos del sobrenadante del esputo inducido sobre la apoptosis de los eosinófilos de sangre periférica**

Con el fin de evaluar el posible efecto de la  $PGE_2$  presente en el sobrenadante del esputo sobre la apoptosis eosinofílica, se realizaron cultivos de eosinófilos purificados de sangre periférica de pacientes. Para dichos ensayos se utilizó el sobrenadante del esputo de varios sujetos de ambas patologías. Se realizan un total de 10 ensayos por grupo cuyas condiciones se describen a continuación:

- Concentración celular:  $1 \times 10^5$  células/pocillo en 250  $\mu$ L de medio (RPMI 1640 completo).
- Sobrenadante: 250  $\mu$ L/pocillo.
- Tiempo: 18 h.

Para evaluar la apoptosis se emplea la citometría de flujo y el kit y protocolo desarrollado previamente (kit rh Annexin V/ FITC<sup>®</sup>, Bender MedSystems, Viena, Austria).

### **3.10.2. Efectos de la $PGE_2$ y agonistas sintéticos sobre la apoptosis de los eosinófilos de sangre periférica**

De la misma forma que con el sobrenadante del esputo, para evaluar el papel efector de la  $PGE_2$  con respecto a la apoptosis, se han llevado a cabo cultivos celulares de eosinófilos purificados de sangre periférica de pacientes ( $n=10$ ).

Se han realizado distintas pruebas para encontrar la concentración idónea de distintos parámetros como son:

- La concentración celular.
- La concentración de PGE<sub>2</sub>.
- La concentración de los agonistas de EP2 y EP4.
- El tiempo de incubación.

En estos ensayos, los agonistas objeto de estudio son los de los receptores EP2 y EP4, ya que se postula que son estos receptores a través de los cuales la PGE<sub>2</sub> ejerce un papel protector en las patologías de estudio. Así, el Butaprost (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, Estados Unidos) es un agonista del receptor EP2, y el 11-deoxi-prostaglandina E<sub>1</sub> (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, Estados Unidos) es un agonista simultáneo de los receptores EP2 y EP4.

Tras varios ensayos, se establecieron las condiciones más adecuadas:

- 0,2 – 0,5 x 10<sup>6</sup> células/mL/pocillo.
- 100 nM y 1 µM de PGE<sub>2</sub> (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, Estados Unidos).
- 100 nM y 1 µM de los agonistas de los receptores EP2 y EP4.
- 18 h de incubación.

### **3.11. CULTIVOS DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS BRONQUIALES (CMLB)**

En los ensayos para analizar el posible efecto de la PGE<sub>2</sub> sobre el proceso de remodelación, se ha utilizado una línea humana no oncogénica de células musculares lisas bronquiales (BSMC, Cambrex Bio Science, Karlskoga, Suecia).

Para los ensayos de proliferación es necesario que las células estén en el cuarto o quinto pase de crecimiento. Así, previamente, estas células se cultivan siguiendo el protocolo proporcionado por la propia casa comercial, el cual se describe a continuación.

El medio de cultivo idóneo para este tipo celular es el SmGM-2 BulletKit<sup>®</sup> (Cambrex BioScience, Karlskoga, Suecia), que contiene el medio basal (SmBM<sup>®</sup>, Smooth Muscle cell Basal Medium) al que se le añaden los siguientes reactivos:

- Factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF).
- Insulina.
- Factor de crecimiento de fibroblastos humanos (hFGF-B).
- Suero de ternera fetal (STF).
- Antibióticos: gentamicina/anfotericina-B.

Las células se cultivan en flask de 25 cm<sup>2</sup> (Iwaki, Japón), a una concentración de 3500 células/cm<sup>2</sup> y con un volumen de 1 mL/5 cm<sup>2</sup> (entre 5 y 6 mL por flask).

Cuando la proliferación celular alcanza el 70% de la superficie, las células se despegan con Tripsina-EDTA (2 mL por flask de 25 cm<sup>2</sup>), previo lavado con HEPES-BSS (Cambrex BioScience, Karlskoga, Suecia), ya que el suero de ternera fetal que contiene el medio inactiva a la tripsina.

Tras incubarlas a 37°C durante 6 minutos, se golpea el flask para despegar las células y se añade TNS (Cambrex BioScience, Karlskoga, Suecia) para inactivar la tripsina. Se recoge todo el volumen, se añaden 2 mL por flask de HEPES-BSS para recoger las células que puedan quedar en el flask y se centrifuga a 220 g durante 5 minutos. Se elimina el sobrenadante y el sedimento se resuspende en 2-3 mL de medio de cultivo.

A continuación se realiza un recuento y se evalúa la viabilidad de la muestra, cultivándose de nuevo a una concentración celular de 3500 células/cm<sup>2</sup> (previamente indicada).

### **3.11.1. Proliferación de células musculares lisas bronquiales (CMLB) cultivadas con sobrenadante de esputo inducido**

Al igual que en el caso de la apoptosis eosinofílica, se ha estudiado el efecto del sobrenadante del esputo de diversos pacientes sobre la proliferación de las CMLB.

Las condiciones de dichos ensayos fueron las siguientes:

- 4 x 10<sup>4</sup> células/100 µL/pocillo.
- 100 µL sobrenadante/pocillo.

Para la evaluación de la proliferación celular se utiliza el Test de Proliferación Celular en placa, ELISA Biotrak<sup>®</sup> (Amersham Cell Proliferation Biotrak ELISA System, Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido). Este kit es un método colorimétrico alternativo a la técnica clásicamente empleada para el estudio de proliferación: la timidina tritiada. Dicho método se basa en la medición de la incorporación de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU), durante la síntesis de

ADN, en las células en proliferación. De esta forma, emplea una pirimidina análoga, BrdU, en lugar de timidina.

Las CMLB se incuban durante 72 h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en presencia de los estímulos correspondientes. Transcurrido este tiempo, se añade la BrdU (10 µL) y se incuban en las mismas condiciones durante 24 horas más. A continuación, y tras eliminar el sobrenadante del esputo, se añaden 200 µL/pocillo de la solución de fijación, la cual permite la desnaturalización y fijación de las células, incubándose durante 30 minutos a temperatura ambiente (RT). Posteriormente, se añaden 200 µL/pocillo de solución de bloqueo y se incuba 30 minutos a temperatura ambiente.

Se elimina la solución de bloqueo y se incuba con el anticuerpo anti-BrdU marcado con peroxidasa durante 90 minutos a RT. Finalmente, tras 3 lavados de 10 minutos cada uno, se incuban las células con 100 µL/pocillo del sustrato TMB entre 5 y 30 minutos, a temperatura ambiente, en agitación y en condiciones de oscuridad. Se detiene la reacción añadiendo 25 µL de ácido sulfúrico 1 M, leyéndose la absorbancia a 450 nm de forma inmediata en el lector de placa anteriormente utilizado.

Los valores de absorbancia se correlacionan directamente con la cantidad de síntesis de ADN y, en consecuencia, con el porcentaje de proliferación de las células en cultivo.

### **3.11.2. Acción de la PGE<sub>2</sub> sintética, agonistas y antagonistas de sus receptores sobre la proliferación de las células musculares lisas bronquiales (CMLB)**

En los ensayos de proliferación de las células musculares lisas bronquiales (CMLB) se han evaluado, además del efecto del sobrenadante del esputo, tanto el efecto de la PGE<sub>2</sub> comercial (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, Estados Unidos), como el de dos agonistas diferentes de los receptores de la PGE<sub>2</sub>: el Butaprost y la 11-deoxi-PGE<sub>1</sub> (mencionados previamente en el capítulo 3.10.2), ambos utilizados también en los ensayos de apoptosis con los eosinófilos purificados de sangre periférica. También se utilizaron dos antagonistas de los receptores de la PGE<sub>2</sub>: AH6809 (antagonista de los receptores EP1 y EP2, Sigma-Aldrich, MO, Estados Unidos) y el AH23848 (antagonista del receptor EP4, Sigma-Aldrich, MO, Estados Unidos). Estos ensayos con los productos sintéticos nos permiten confirmar si los resultados obtenidos en los ensayos con el sobrenadante del esputo de los pacientes, se podrían asociar o no a la PGE<sub>2</sub>.



El ensayo con la PGE<sub>2</sub> sintética y los agonistas se ha reproducido un total de 10 veces por duplicado, mientras que el cultivo con los antagonistas se ha reproducido 12 veces por duplicado. Se utilizan  $1 \times 10^4$  células/pocillo, siguiendo las indicaciones del kit comercial. Los puntos de estudio fueron:

- Control negativo. Células en proliferación sin ningún tipo de estímulo adicional.
- PGE<sub>2</sub>:  $10^{-6}$  M,  $10^{-9}$  M y  $10^{-12}$  M.
- Butaprost:  $10^{-6}$  M,  $10^{-9}$  M y  $10^{-12}$  M.
- 11-deoxi-PGE<sub>1</sub>:  $10^{-6}$  M,  $10^{-9}$  M y  $10^{-12}$  M.
- AH6809:  $10^{-6}$  M y  $10^{-5}$  M.
- AH23848:  $10^{-6}$  M y  $10^{-5}$  M.

Las concentraciones, tanto para la PGE<sub>2</sub> como para los agonistas y antagonistas, se han establecido tras diversas pruebas.

En el caso de los ensayos con los antagonistas, las células se incubaron durante 1 hora con las diversas concentraciones de los mismos y, transcurrido este tiempo, se añadió la PGE<sub>2</sub> sintética, siendo el protocolo a partir de este punto igual que en los otros tipos de ensayos.

Estos ensayos de proliferación se realizan con el mismo kit empleado en los ensayos del apartado 3.11.1 (ELISA Biotrak<sup>®</sup>, Amersham, Reino Unido).

### 3.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

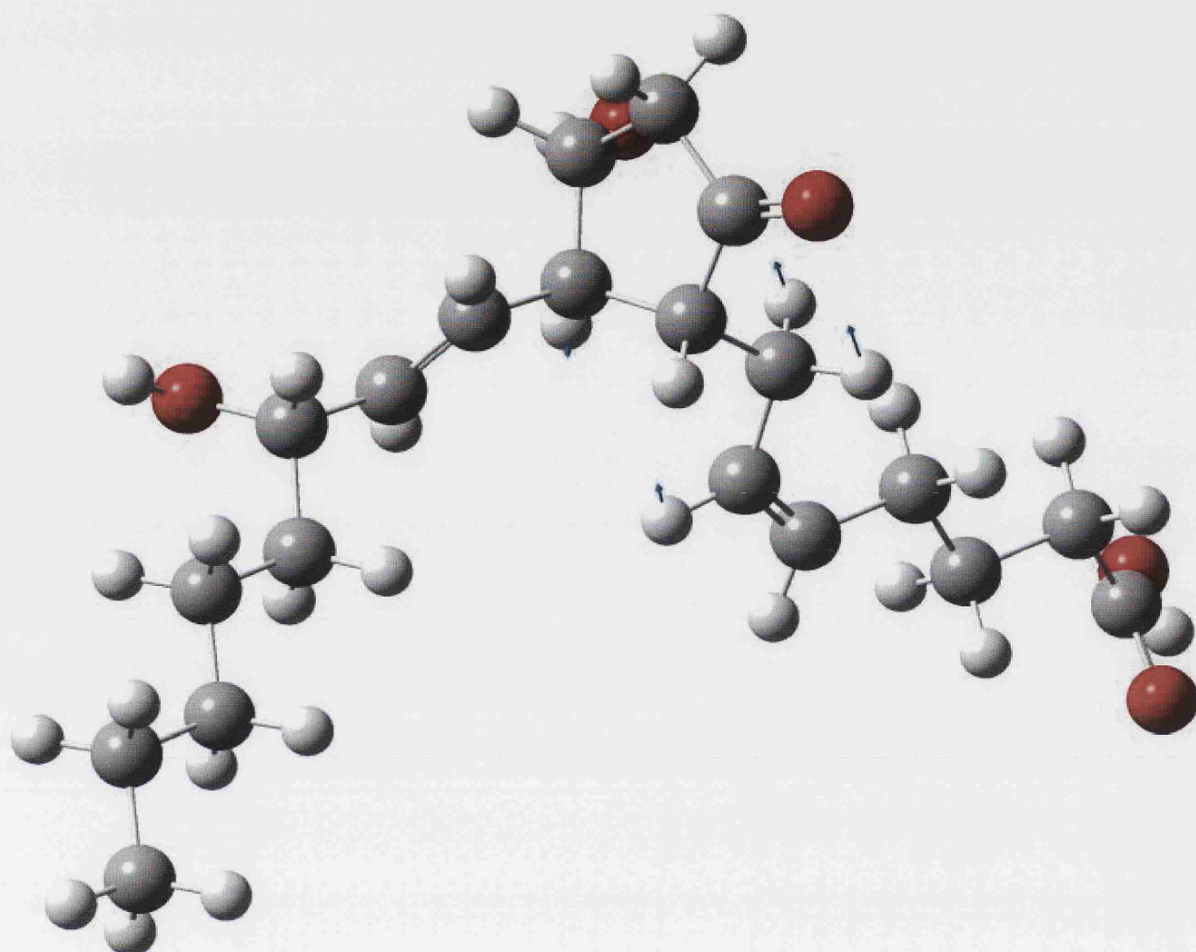
Las características clínicas de los pacientes han sido definidas usando estadísticos descriptivos, siendo expresadas como la mediana y el rango o la media geométrica y el rango.

El recuento celular diferencial en esputo entre los tres grupos de estudio así como la comparación de la concentración de los mediadores lipídicos se realizó: usando el test de Kruskal-Wallis y U-test de Mann-Whitney para los datos no paramétricos, y ANOVA y test no pareado con la corrección de Welch para los datos paramétricos.

Los valores de los ensayos de expresión génica fueron expresados como media de la expresión en relación al grupo control. El carácter de normalidad fue analizado con el test de Kolmogorov-Smirnov, estudiando la significación estadística mediante el programa R con el test de Wilcoxon, dado el bajo número de muestra por grupo y su carácter no paramétrico.

El grado de significación estadística aplicado es  $p < 0,05$ , es decir, se acepta como máximo una probabilidad de error no superior al 5%. Se ha considerado que existe diferencia estadísticamente significativa a partir de una  $p$  menor o igual a 0,05.

El análisis estadístico realizado en este estudio se ha llevado a cabo usando el programa Graphpad Instat3 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, Estados Unidos) así como con el programa R de acceso libre en la red.



## *4. Resultados*



## 4.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES DEL ESTUDIO

El punto de partida del proyecto fue la clasificación de los individuos que han constituido los tres grupos de estudio. Así, tanto los individuos asmáticos como los pacientes con bronquitis eosinofílica, cumplieron los criterios de clasificación previamente establecidos de acuerdo con las guías actuales (características detalladas en el apartado 3.1.1). Esta clasificación es de gran importancia para la obtención de grupos homogéneos de individuos.

Los sujetos incluidos en el estudio presentaron las características clínicas y demográficas que se detallan en la Tabla VIII.

	Controles (n=13)	Bronquitis eosinofílica (n=19)	Asma (n=15)
<b>Edad (años) *</b>	29 (20 – 42)	47 (17 – 71)	35 (14 – 61)
<b>Sexo (% hombres)</b>	5 (38,46%)	12 (63,16%)	6 (40%)
<b>Atopia</b>	0	47,06%	73,33%
<b>Duración síntomas (años) †</b>	0	4,5 (0,5 – 15)	6,5 (0,5 – 18)
<b>Tabaquismo</b>			
<b>Fumadores</b>	0	2 (10,53%)	0
<b>Exfumadores</b>	0	7 (36,84%)	4 (26,67%)
<b>No fumadores</b>	13 (100%)	10 (52,63%)	11 (73,33%)
<b>FEV<sub>1</sub> teórico (%)*</b>	105 (100 – 131)	105,5 (77 – 127)	100,5 (73 – 141)
<b>FEV<sub>1</sub>/FVC (%) *</b>	85 (80 – 93)	81,23 (69 – 91)	81,24 (65,3 – 94,79)
<b>PC<sub>20</sub> metacolina (mg/ml)</b>	Negativa	Negativa	4,77 (1,25 – 8)

**Tabla VIII. Características clínicas y demográficas de los sujetos del estudio.** FVC: capacidad vital forzada; FEV<sub>1</sub>: volumen espiratorio forzado en el primer segundo. \* Mediana (rango); † Media geométrica (rango).

Como se observa en la Tabla VIII, la gran mayoría de los individuos de los tres grupos se encuentran dentro de un rango intermedio de edad, entre 30 y 50 años, siendo menor el promedio de edad en el grupo control, pero sin presentar diferencias significativas con el resto de los grupos de estudio.

En cuanto a la relación por sexo, tanto en el grupo de sujetos sanos como en el grupo de asma es mayor el porcentaje de mujeres, mientras que en el grupo de BE el porcentaje de hombres representa el 63,16% del total de la población estudiada.

Con respecto a la atopía, aunque el porcentaje es mayor en el grupo de sujetos asmáticos estando también aumentada en este grupo la duración media de los síntomas, no hay diferencias estadísticamente significativas.

Aunque algunos de los individuos del estudio refirieron haber sido fumadores o serlo en la actualidad, la totalidad de los individuos control así como la mayoría de los individuos de los grupos de patología son no fumadores, siendo esto un dato de gran importancia ya que el hábito tabáquico podría influir en algunas de las valoraciones o análisis realizados en el estudio.

En relación a los resultados de las pruebas clínicas que evalúan la función pulmonar, el cociente  $FEV_1/FVC$  se encuentra dentro del rango de normalidad (inferior al 80%)<sup>[159,160]</sup> en los dos grupos, aunque existen individuos de ambas patologías de estudio que se encuentran por debajo de dicho valor de normalidad.

Además, sólo los individuos del grupo de asma presentan pruebas de metacolina positivas, siendo este resultado uno de los criterios diagnósticos de dicha enfermedad y una de las características principales que diferencian esta patología de la BE, ya que implica la existencia de hiperreactividad bronquial.

## 4.2. PATRÓN CELULAR INFLAMATORIO

Tanto el asma como la BE se caracterizan por ser enfermedades respiratorias con un importante infiltrado celular inflamatorio. Por ello, se estudió el patrón celular mediante citometría de flujo, tanto en el esputo inducido (EI) como en la muestra de sangre periférica, para ver si existen diferencias entre ambas entidades con respecto a este parámetro tanto en el foco inflamatorio como a nivel sistémico.

### 4.2.1. Análisis del patrón celular en sangre periférica

El análisis de la celularidad en sangre periférica proporcionó los resultados que se muestran en la Tabla IX.

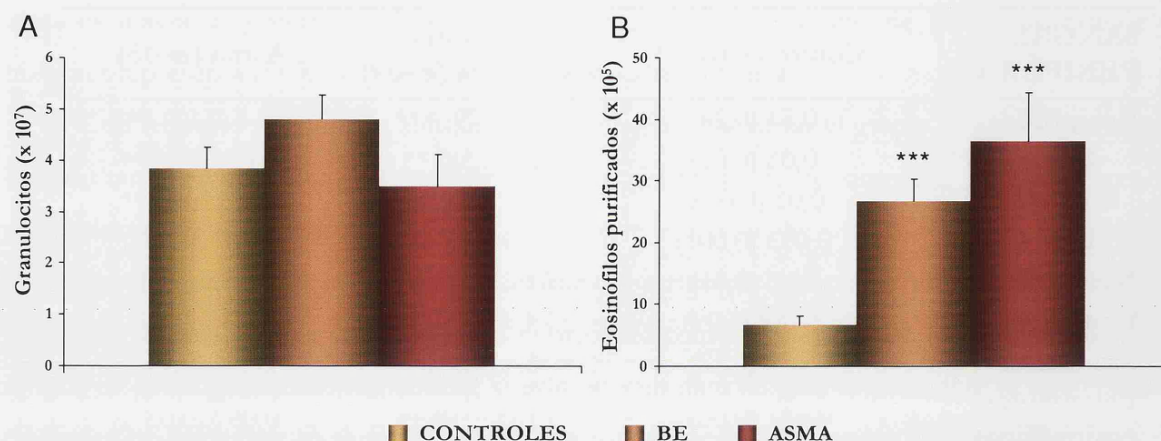
<b>SANGRE PERIFÉRICA</b>	<b>Controles (n=13)</b>	<b>Bronquitis eosinofílica (n=19)</b>	<b>Asma (n=15)</b>
<b>Eosinófilos</b>	0,54 (0,28)	4,43 (0,79) ***	3,64 (0,83) ***
<b>Eos. CD69<sup>+</sup></b>	0,03 (0,02)	5,95 (2,58) **	6,1 (1,36) ***
<b>Eos. HLA-DR<sup>+</sup></b>	0,01 (0,005)	1,31 (0,43) **	2,56 (1,06) **
<b>Eos. CD25<sup>+</sup></b>	0,003 (0,001)	0,104 (0,06)	0,017 (0,017)
<b>Neutrófilos</b>	71,8 (3,51)	64,29 (2,25)	62,82 (3,86)
<b>Linfocitos</b>	19,88 (3,29)	24,36 (1,92)	26,83 (3,22)
<b>Monocitos</b>	5,79 (0,52)	6,4 (0,93)	5,94 (0,44)
<b>Precursores eosinofílicos</b>	0,037 (0,007)	0,105 (0,069)	0,087 (0,037)

**Tabla IX. Análisis de la celularidad de sangre periférica.** Los valores reflejados en la tabla representan el valor medio del porcentaje (error estándar de la media o SE) de los sujetos del estudio (\*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$  frente a controles). El porcentaje de activación es respecto al total de eosinófilos, no en relación a la población general.

Tanto los pacientes asmáticos como los diagnosticados de BE presentan, a nivel sistémico, un aumento estadísticamente significativo de eosinófilos con respecto a los sujetos sanos ( $p < 0,001$ ), aunque el porcentaje de dicho tipo celular es muy similar entre ambas patologías (Tabla IX).

Se evaluó el grado de activación de los eosinófilos a través de tres marcadores: CD69, HLA-DR y CD25. En los tres casos, los individuos de ambas patologías presentan un mayor porcentaje de activación que los individuos sanos, alcanzando la significación estadística con dicho grupo, tanto en el caso de CD69 como en el del HLA-DR. El porcentaje de eosinófilos CD69<sup>+</sup> es muy similar entre asma y BE. Sin embargo, mientras que los pacientes asmáticos presentan un mayor porcentaje de HLA-DR<sup>+</sup>, son los individuos con BE los que poseen una marcada elevación del porcentaje de eosinófilos CD25<sup>+</sup> (más de 6 y 34 veces que los pacientes asmáticos y los individuos sanos, respectivamente), aunque entre ambas patologías no existen diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los marcadores de activación.

En relación al resto de subpoblaciones leucocitarias evaluadas, los tres grupos de estudio poseen porcentajes de neutrófilos y monocitos muy similares y dentro de los rangos de normalidad<sup>[16]</sup>. En el caso de la población linfocitaria, se observa un ligero incremento en los individuos con BE y en los pacientes asmáticos con respecto al grupo control (1,22 y 1,35 veces, respectivamente). Finalmente, los precursores eosinofílicos se encuentran incrementados, con respecto al grupo control, 2,84 y 2,35 veces en el grupo de BE y asma respectivamente, aunque no se llega a alcanzar la significación estadística (Tabla IX).



**Figura 18. Cuantificación de granulocitos y eosinófilos purificados de sangre periférica.** Las gráficas representan los valores medios  $\pm$  SE de (A) los granulocitos ( $\times 10^7$ ) y (B) los eosinófilos purificados ( $\times 10^5$ ) por  $\text{mm}^3$  de sangre periférica de cada uno de los grupos de estudio (\*\* $p < 0,001$  vs controles).

Además de analizar el patrón celular mediante citometría de flujo, se cuantificó el número de granulocitos y eosinófilos purificados de sangre periférica mediante una cámara Neubauer (ver apartado 3.4), observándose valores muy similares de granulocitos entre los tres grupos (Figura 18.A). Los niveles de eosinófilos totales se encuentran incrementados tanto en el grupo de BE como en el grupo de asma, siendo las diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control ( $p < 0,001$ ; Figura 18.B).

Todos estos resultados demuestran que, a nivel sistémico, son los eosinófilos y sus precursores los que principalmente se encuentran incrementados en los individuos con BE y asma, lo que pone de manifiesto la relevancia de este tipo celular en ambas patologías.

#### 4.2.2. Análisis de la celularidad en el esputo inducido

De forma paralela a la evaluación del componente celular en sangre periférica, se utilizó el sedimento celular del esputo inducido para analizar la composición del infiltrado característico del foco inflamatorio en cada uno de los grupos de estudio. Además, se determinó el número de células totales en el esputo, así como el porcentaje de viabilidad y de células escamosas. Este último servirá para evaluar el grado de contaminación (vías altas) de la muestra.

Las muestras de esputo de los tres grupos de estudio presentaron entre dos y cinco millones de células (Figura 19.A), siendo los pacientes con BE los que poseían un valor medio



más elevado, seguidos por los sujetos control y, finalmente, los individuos asmáticos, no existiendo significación estadística entre los grupos.

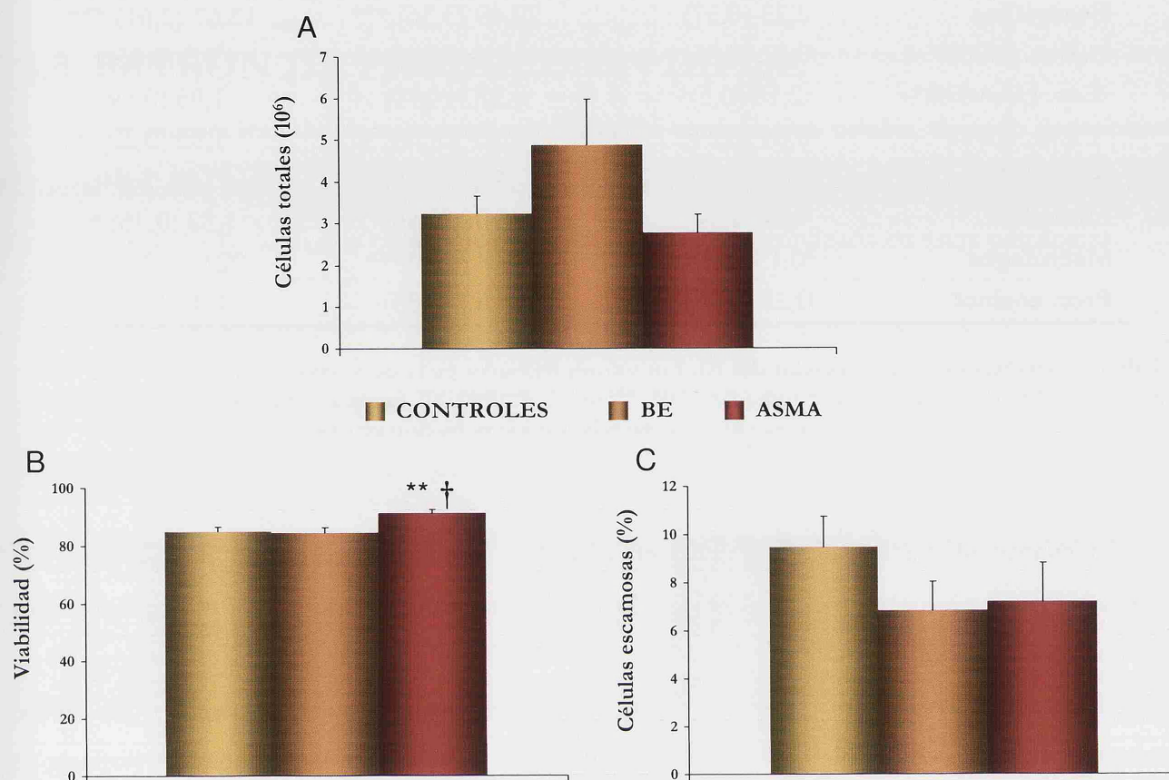


Figura 19. Recuento de células totales (A), porcentaje de viabilidad (B) y porcentaje de células escamosas (C) en el esputo inducido evaluado mediante microscopía en una cámara Neubauer. Las gráficas representan la media  $\pm$  SE de los sujetos del estudio (\*\* $p < 0,01$  respecto a los controles; † $p < 0,05$  respecto al grupo de BE).

Todas las muestras cumplieron los criterios de aceptación establecidos en relación al porcentaje de viabilidad y contaminación de vías altas. Aunque los porcentajes de viabilidad son muy similares entre los controles sanos, BE y asma (84,8%, 84,16% y 90,86%, respectivamente), este último es el que posee un porcentaje más elevado, siendo estadísticamente significativo al compararlo con el grupo control ( $p < 0,01$ ) como con el grupo de BE ( $p < 0,05$ ) (Figura 19.B).

En relación al porcentaje de células escamosas, el cual proporciona información sobre el grado de contaminación de la muestra, el grupo control es el que posee un porcentaje más elevado aunque no existen diferencias reseñables entre los tres grupos (Figura 19.C).

En la evaluación del patrón celular del EI, se observa que los pacientes con patología respiratoria presentan, en el foco inflamatorio, un importante reclutamiento eosinofílico (casi 10 veces más) al compararlo con el valor observado en el grupo de individuos sanos ( $p < 0,0001$ , Tabla X), aunque entre asma y BE no existen diferencias relevantes.

ESPUTO INDUCIDO	Controles ( <i>n</i> =13)	Bronquitis eosinofílica ( <i>n</i> =19)	Asma ( <i>n</i> =15)
Eosinófilos	2,23 (0,57)	22,49 (3,36) ***	15,67 (2,61) ***
Eos. CD69 <sup>+</sup>	0,72 (0,21)	2,64 (0,98)	2,3 (0,85)
Eos. HLA-DR <sup>+</sup>	2,18 (0,5)	3,33 (0,79)	1,95 (0,59)
Eos. CD25 <sup>+</sup>	0,64 (0,24)	2,51 (0,58) *	1,03 (0,22)
Neutrófilos	41,61 (4,88)	45,07 (4,9)	47,94 (5,84)
Linfocitos	4,84 (1,44)	2,02 (0,56)	1,32 (0,35) *
Macrófagos	50,13 (5,39)	26,8 (4,29) **	22,9 (5,74) **
Prec. eosinof.	0,23 (0,08)	0,67 (0,33)	1,35 (0,78)

**Tabla X. Análisis del patrón celular del EI.** Los valores reflejados en la tabla representan el valor medio del porcentaje (SE) de los sujetos del estudio (\* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$  frente a controles). El porcentaje de activación es respecto al total de eosinófilos, no en relación a la población general.

En cuanto al análisis de activación en este tipo celular, el grupo de BE presenta un porcentaje mayor en los tres marcadores evaluados, comparándolo tanto con el grupo control como con los individuos asmáticos. El patrón de eosinófilos CD69<sup>+</sup> es similar en los grupos de patología, estando elevado en relación al grupo de sujetos sanos. A su vez, mientras que en los pacientes con BE los eosinófilos HLA-DR<sup>+</sup> se encuentran ligeramente incrementados respecto al grupo control, y en un porcentaje muy similar al observado en el grupo de pacientes asmáticos, estos cambios no conllevan significación estadística. Sin embargo, el aumento del porcentaje de eosinófilos CD25<sup>+</sup> en el grupo de BE es estadísticamente significativo con respecto a los controles pero no frente al grupo de asma, aunque su valor es el doble que el observado en este último grupo (Tabla X).

Los tres grupos de estudio presentan porcentajes muy homogéneos en el caso de neutrófilos dentro, todos ellos, de los valores considerados normales en las muestras de esputo de los individuos sanos<sup>[162]</sup>. Sin embargo, los pacientes con asma y BE presentan un descenso tanto de macrófagos ( $p<0,01$ ) como de linfocitos ( $p<0,05$  asma *vs* controles sanos).

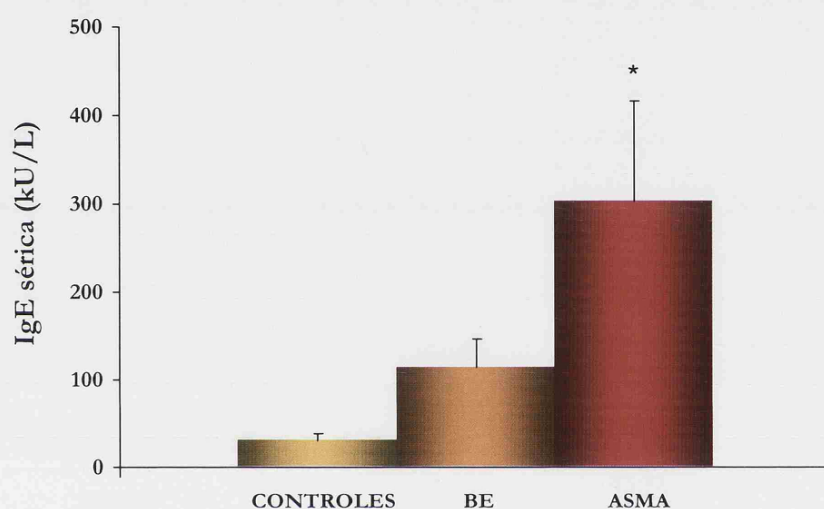
Por último, de forma similar a lo observado en sangre periférica, en los precursores eosinofílicos se observa un aumento, tanto en los individuos asmáticos como en el grupo de BE respecto a los controles, aunque no se alcanza la significación estadística (Tabla X).

En vista de los resultados obtenidos se puede concluir que, al igual que en la muestra de sangre periférica, en el EI el porcentaje de eosinófilos se encuentra alterado, tanto en el grupo de

BE como en el de asma, por lo que queda patente que dicho tipo celular participa, de alguna manera, en la fisiopatología de ambas entidades.

### 4.3. PATRÓN DE PRODUCCIÓN DE IgE

La respuesta inmunológica, además de tener un componente celular, tiene un componente humoral. En este estudio se han analizado, mediante InmunoCap® (Phadia, Suecia), los niveles séricos de IgE total, dado que es la principal inmunoglobulina implicada en estas patologías.



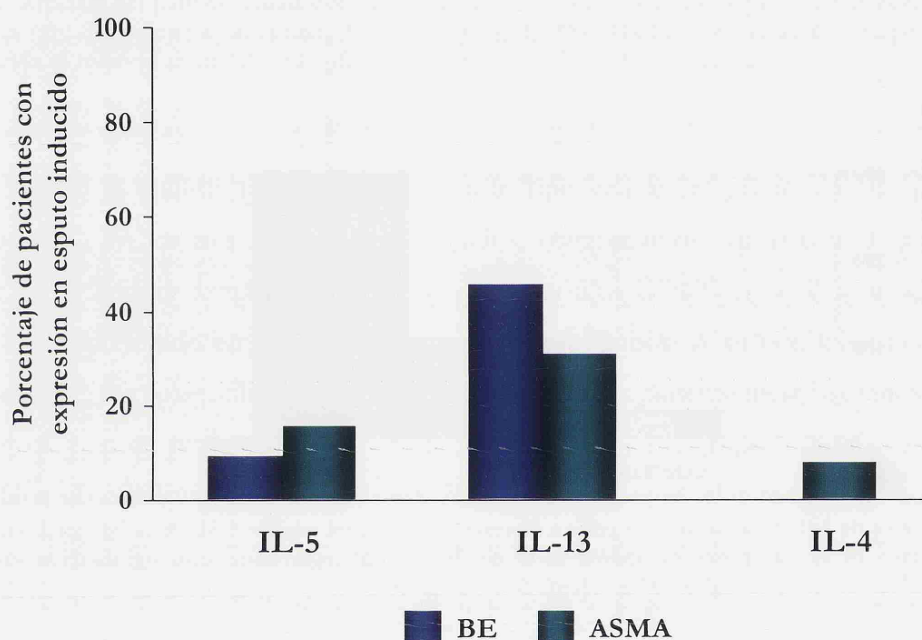
**Figura 20. Niveles de IgE total sérica.** La gráfica representa los valores medios  $\pm$  SE de la IgE total sérica (kU/L). El grupo de asma es el que posee un mayor nivel de dicha inmunoglobulina, con significación estadística al compararlo con los niveles observados en los sujetos control (\* $p < 0,05$ ).

Como muestra la figura 20, son los pacientes asmáticos los que presentan mayores niveles de IgE sérica, comparándolos tanto con los individuos sanos ( $p=0,0296$ ) como con los pacientes de BE (aunque en este caso no existe significación estadística). A pesar de que en ambas patologías los valores medios superan el rango de normalidad (Valor positivo: mayor de 100 kU/L), es en el grupo de asma donde se alcanzan los valores más altos. Además, el porcentaje de individuos con valores superiores a 100 kU/L en el grupo de BE es del 31,58%, mientras que en el grupo de asma es del 46,67%.

La existencia de valores superiores de IgE en el grupo de asmáticos posiblemente esté vinculado al mayor porcentaje de atopía observado en este grupo (ver Tabla VIII).

#### 4.4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE DIVERSOS FACTORES Y CITOCINAS EN EL ESPUTO INDUCIDO

Tanto el asma como la BE, además de presentar un infiltrado inflamatorio celular, se caracterizan por la presencia de diversas citocinas y factores pro-inflamatorios. Para determinar si existe un patrón específico en cada una de las patologías de estudio, se evaluaron los niveles génicos de múltiples citocinas características de las respuestas Th1, Th2 así como reguladoras en el esputo inducido, ya que su localización en el foco inflamatorio permitiría conocer el microambiente existente en la zona de lesión.



**Figura 21. Porcentaje de pacientes con expresión génica en el sedimento del EI de citocinas Th2.** La gráfica representa el porcentaje de individuos, sobre el número total de sujetos de cada grupo, que expresan las distintas citocinas. Se observa una total ausencia de expresión de todas las citocinas Th2 en el grupo de individuos sanos. Además, la IL-4 sólo es expresada en el grupo de asma.

Al evaluar las citocinas características de la respuesta Th2 como son la IL-5, la IL-13 y la IL-4, no se halló expresión de ninguna de ellas en el grupo de individuos sanos, lo que implica una clara diferencia entre dicho grupo y los individuos con patología.

En cuanto a la distribución de las citocinas en cada grupo, mientras que hay mayor número de pacientes asmáticos que expresan IL-5, es más elevado el número de paciente con BE que expresan IL-13, aunque todo dentro de valores muy similares. Al analizar la distribución de la IL-4, tanto el grupo control como el de pacientes con BE carecen de expresión de dicha citocina,



siendo los pacientes asmáticos el único grupo en el que se detecta expresión de IL-4 en el sedimento del esputo.

A diferencia de las citocinas Th2, el patrón de distribución de las citocinas reguladoras y Th1 es similar en los tres grupos, siendo expresadas por todos los individuos del estudio, aunque todas ellas en menor cantidad que las citocinas Th2.

En relación a los niveles de expresión génica, el grupo de BE posee niveles ligeramente superiores de IL-10, aunque tanto los individuos de dicha patología como los pacientes asmáticos presentan valores muy similares a los observados en el grupo control (Figura 22.A).

Con respecto al IFN- $\gamma$ , tanto los individuos con BE como los individuos asmáticos, presentan una menor expresión comparado con el grupo control siendo, respectivamente, 3 y 5 veces inferior. Dicha disminución no es estadísticamente significativa. Aunque la expresión relativa media en ambos grupos patológicos está disminuida al compararla con la de los individuos sanos, los pacientes con BE presentan el doble de expresión que el grupo de pacientes asmáticos (Figura 22.A).

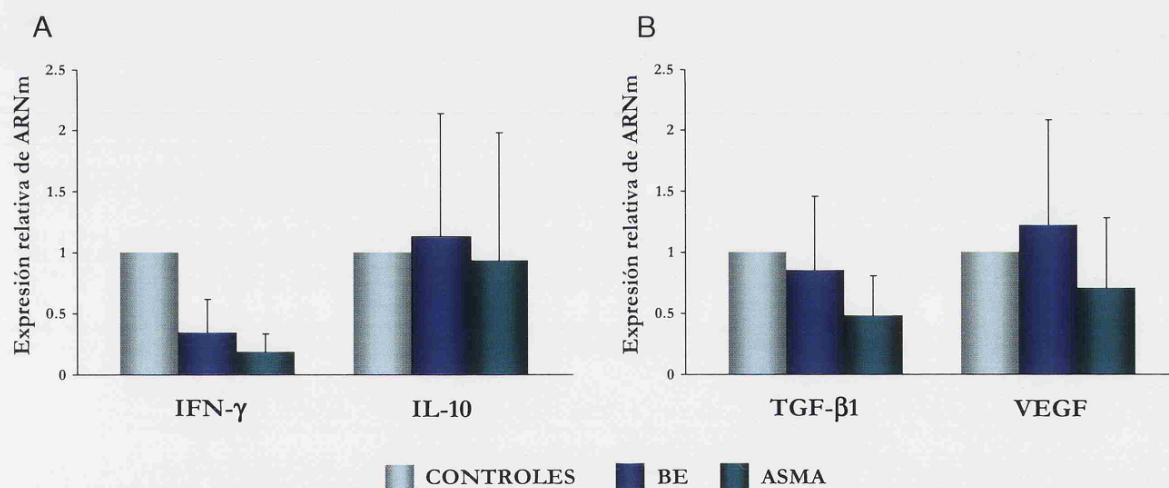


Figura 22. Niveles de expresión génica relativa de diversas citocinas en el sedimento del EI. Los gráficos representan la expresión media  $\pm$  SD de diversas citocinas relativizada frente al grupo control. A: IFN- $\gamma$  e IL-10, B: TGF- $\beta$ 1 y VEGF.

También se analizaron los niveles de expresión de ARNm de otros factores importantes en el proceso inflamatorio como son el TGF- $\beta$ 1 y el VEGF.

En relación al TGF- $\beta$ 1, en los grupos de individuos con patología se observa una disminución al relativizar su expresión respecto al grupo de individuos control, siendo esta disminución de 1,18 y 2 veces en BE y asma, respectivamente (Figura 22.B).

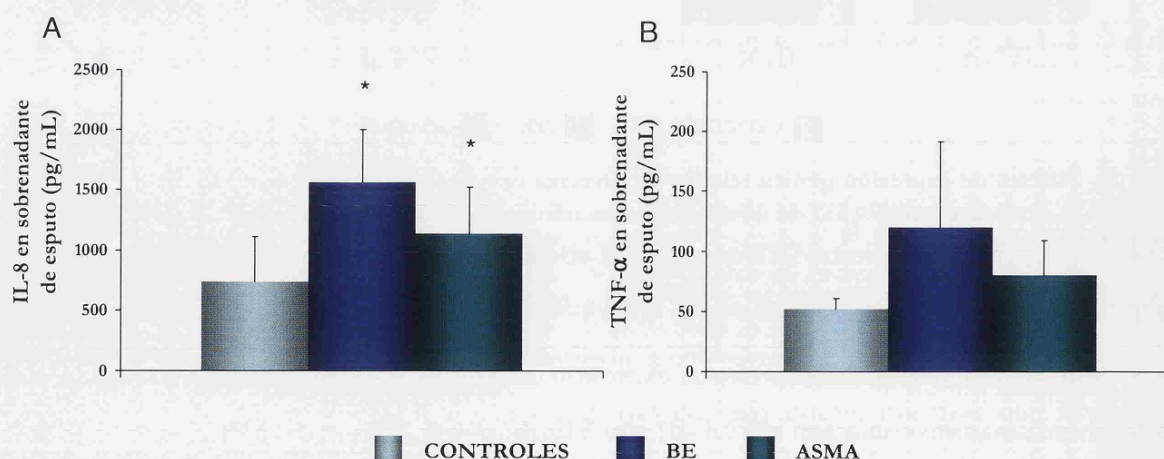
Finalmente, el grupo de individuos asmáticos es el que posee los valores más bajos de VEGF a nivel génico (Figura 22.B), estando el valor del grupo de BE por encima del observado en el grupo control sano, aunque ninguna de estas diferencias es estadísticamente significativa.

Los pacientes diagnosticados tanto de asma como de BE presentan niveles de expresión génica detectables por RT-PCR de citocinas Th2, siendo imposible su detección en el grupo control, lo que corrobora el patrón Th2 asociado a estas patologías. A su vez, en la BE se obtuvieron niveles superiores (en relación al grupo de asma) de IL-10 y VEGF aunque sin significación estadística. Todos los sujetos diagnosticados de asma o de BE presentan una expresión de IFN- $\gamma$  inferior a la observada en los individuos sanos.

Así, en ambas patologías existe un patrón similar de tipo clásicamente Th2, existiendo sutiles diferencias entre ambos grupos en relación a las citocinas Th1 y reguladoras.

#### 4.5. EVALUACIÓN PROTEICA DE DIVERSAS CITOCINAS Y FACTORES EN EL SOBRENADANTE DEL ESPUTO INDUCIDO

Dado que la respuesta inflamatoria, además de en un componente celular, también se desarrolla en función del ambiente de citocinas y factores existentes en el foco inflamatorio, se llevó a cabo el análisis de la expresión proteica en el sobrenadante del esputo de diversos factores solubles y citocinas pro-inflamatorias como IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-5, IL-10, IFN- $\gamma$  y VEGF.

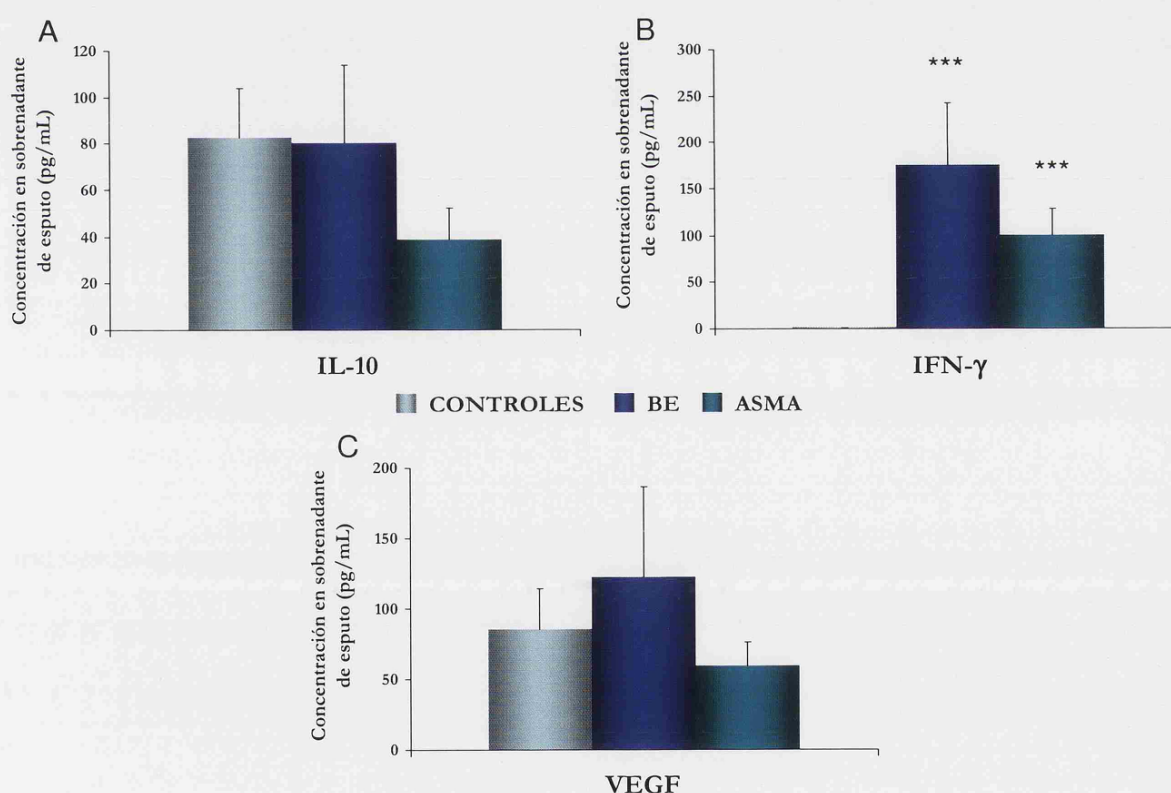


**Figura 23. Niveles proteicos de IL-8 y TNF- $\alpha$  en el sobrenadante del esputo.** Las gráficas representan los valores medios  $\pm$  SE en los diferentes grupos de pacientes del estudio. Tanto la IL-8 (A) como el TNF- $\alpha$  (B), se encuentran incrementados en los pacientes con patologías respiratorias en relación a los individuos sanos, siendo estos niveles siempre mayores en los pacientes con BE que en los individuos asmáticos (\* $p < 0,05$  vs controles).

Como se observa en la Figura 23.A, los niveles de IL-8 se encuentran significativamente incrementados en los pacientes con BE y asma respecto a los controles. Aunque los niveles de TNF- $\alpha$  también se encuentran elevados en los pacientes con patologías respiratorias al compararlos con los de los individuos sanos, no existen diferencias estadísticamente significativas entre controles, BE y asma (51,549 pg/mL, 119,9 pg/mL y 79,606 pg/mL, respectivamente; Figura 23.B).

A su vez, como se aprecia en la Figura 24.A, los niveles de IL-10 son más bajos en los pacientes asmáticos, mientras que en el grupo de BE el patrón de expresión se asemeja al observado en los sujetos sanos.

Por otro lado, tanto los pacientes que padecen asma como los sujetos diagnosticados de BE, presentan unos niveles de IFN- $\gamma$  significativamente elevados ( $p < 0,001$ ) al compararlos con los valores obtenidos en los sujetos sanos, siendo este aumento más pronunciado en el grupo de bronquitis eosinofílica (Figura 24.B).



**Figura 24. Niveles proteicos de citocinas en el sobrenadante del esputo.** Las gráficas representan los valores medios  $\pm$  SE en los diferentes grupos de pacientes del estudio. **A:** IL-10, **B:** IFN- $\gamma$ . Se observa la existencia de significación estadística entre los sujetos sanos y los que conforman los grupos de patología (\*\*\*)  $p < 0,001$ , **C:** VEGF.

Con respecto al VEGF, aunque no existen diferencias estadísticamente significativas, los niveles de este factor en los pacientes con BE y asma se encuentran, respectivamente, por encima y por debajo de los niveles detectados en los sujetos sanos (Figura 24.C).

Por último, sólo reseñar que no se detectaron niveles de IL-5 en ninguno de los grupos de estudio (datos no mostrados).

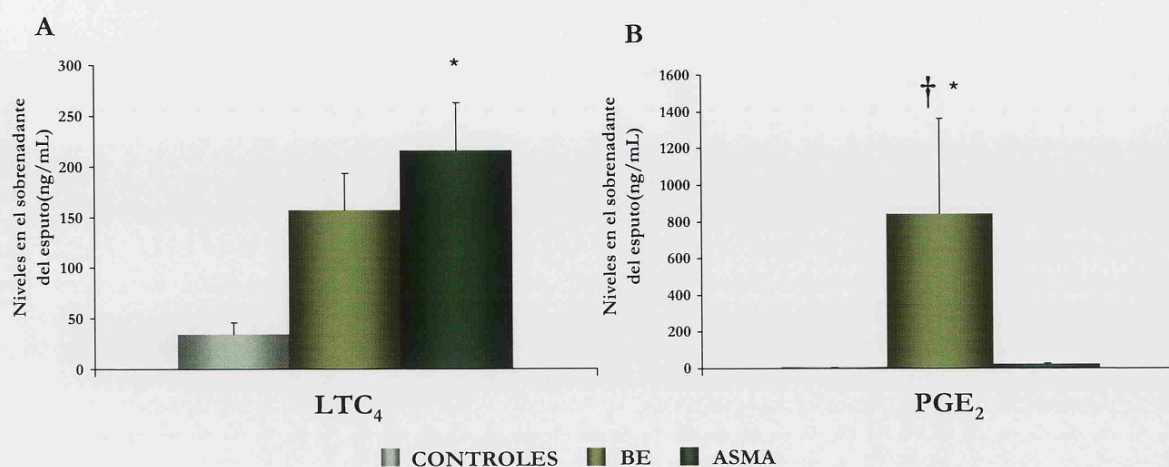
Así, a nivel proteico, los dos grupos de patología expresan niveles superiores de IL-8, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  a los observados en el grupo control. En relación al VEGF, se observa el mismo patrón que el determinado a nivel génico (apartado 4.4). En cuanto a la citocina reguladora IL-10, el comportamiento de los individuos con BE se asemeja al de los sujetos sanos, mientras que los individuos asmáticos poseen niveles inferiores de dicha citocina, lo que podría implicar una menor capacidad de respuesta en los mecanismos protectores de estos pacientes.

### **4.6. EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE LOS MEDIADORES LIPÍDICOS EN EL SOBRENADANTE DEL ESPUTO INDUCIDO**

En numerosas publicaciones y ensayos clínicos se ha demostrado el importante papel que determinados mediadores lipídicos juegan en el desarrollo de la patología asmática. Fundamentalmente, los estudios se centran en los cisteinil-leucotrienos (Cys-LTs), que poseen una importante acción broncoconstrictora, y las prostaglandinas (PGs), dentro de las cuales existen algunas con acción broncodilatadora y otras con acción pro-inflamatoria.

Para determinar una posible producción diferencial de estos mediadores lipídicos en las patologías objeto de estudio se analizaron, en el sobrenadante del esputo, los niveles del LTC<sub>4</sub> (acción broncoconstrictora) y los de la PGE<sub>2</sub> (acción principalmente broncodilatadora) por enzimoimmunoensayo.



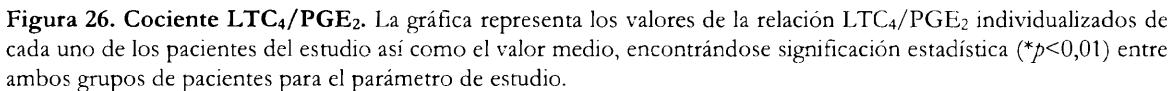


**Figura 25. Niveles de los mediadores lipídicos analizados en el sobrenadante del EI.** En ambas gráficas se representan los valores medios  $\pm$  SE. **A:** LTC<sub>4</sub>, con significación estadística entre los sujetos control y los pacientes asmáticos (\* $p < 0,05$ ), **B:** PGE<sub>2</sub>. Se observan elevados niveles en el grupo de BE existiendo significación estadística frente al grupo control y los sujetos asmáticos († $p < 0,01$  vs controles y \* $p < 0,05$  vs asmáticos, respectivamente).

Tras el correspondiente análisis de los datos, se encontró que los pacientes con asma y BE tienen mayores niveles de LTC<sub>4</sub> que los individuos sanos. Este incremento con respecto a los controles es mayor en el grupo de asma (6,37 veces;  $p < 0,05$ ) que en el de BE (4,64 veces; Figura 25.A).

Sin embargo, al evaluar los niveles de PGE<sub>2</sub> en el sobrenadante del esputo (Figura 25.B), se observó un importante aumento de la concentración de dicha prostaglandina en el grupo de BE (837,07 pg/mL) al compararlo tanto con los individuos sanos (4,01 pg/mL,  $p < 0,01$ ) como con los sujetos con asma (17,02 pg/mL,  $p < 0,05$ ).

Tras la cuantificación y obtención de los niveles de ambos mediadores en el sobrenadante del esputo, se decidió analizar el cociente LTC<sub>4</sub>/PGE<sub>2</sub> puesto que esta relación ya se planteó, en algún estudio previo<sup>[163]</sup>, siendo un parámetro relevante en la patogénesis y pronóstico de enfermedades de tipo autoinmune, caracterizadas por un importante estatus inflamatorio vascular como es el caso de la púrpura de Henoch-Schönlein<sup>[164]</sup>. Además, un reciente artículo de Fernández-Nieto y colaboradores<sup>[165]</sup> este mismo cociente permitió diferenciar a pacientes con sospecha de asma ocupacional con metacolina positiva y provocación específica positiva, de los sujetos con hiperreactividad bronquial (positivos para metacolina) pero provocación específica negativa.



Esta relación entre el LTC<sub>4</sub> y la PGE<sub>2</sub>, así como esta prostaglandina de forma independiente, podrían ser biomarcadores de gran importancia y que posibilitarían diferenciar la BE del asma.

Dado que la PGE<sub>2</sub> presenta una expresión diferencial en ambas patologías pudiendo constituir un punto clave para el discernimiento entre una enfermedad y otra, se decidió estudiar a nivel génico todas las enzimas implicadas en la ruta de biosíntesis de dicha prostaglandina en distintos tipos de muestra: los eosinófilos de sangre periférica (nivel sistémico y tipo celular relevante en ambas patologías de estudio), el sedimento del esputo inducido (muestra procedente del foco inflamatorio) y en biopsias bronquiales, ya que este último tipo de muestra está

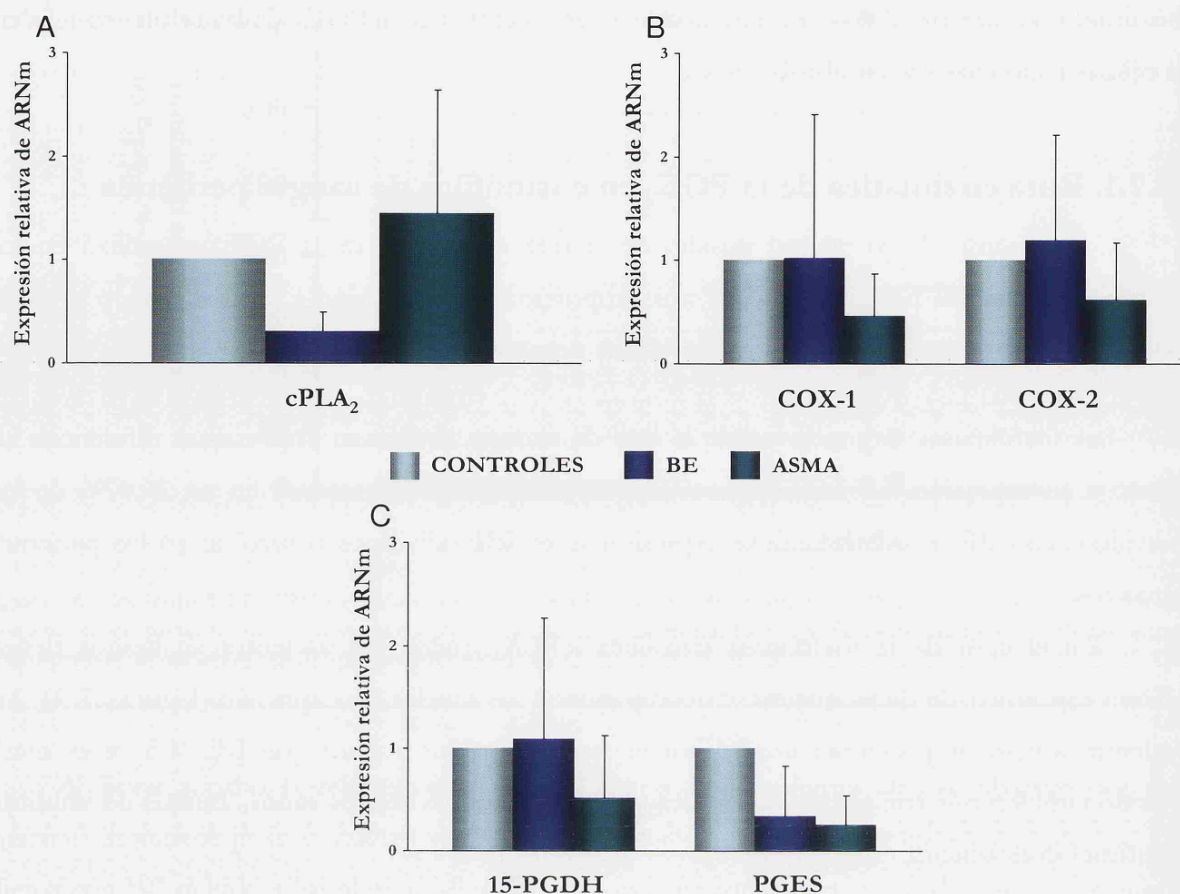
constituido por algunas de las principales células productoras de la  $\text{PGE}_2$ <sup>[166]</sup>: las células epiteliales, las células endoteliales y los fibroblastos.

#### 4.7.1. Ruta enzimática de la $\text{PGE}_2$ en eosinófilos de sangre periférica

Como punto de partida, el estudio de la ruta enzimática de la  $\text{PGE}_2$  se realizó en los eosinófilos de sangre periférica, ya que nos proporcionaría una visión a nivel sistémico y, sobre todo, por el importante papel que los eosinófilos tienen en las patologías de estudio.

Las fosfolipasas, primer paso de la ruta de síntesis, presentan importantes diferencias en cuanto a su expresión. La fosfolipasa secretada,  $\text{sPLA}_2$ , sólo se expresa en un 26,67% de los individuos con BE, no detectándose expresión ni en los individuos control ni en los pacientes asmáticos.

En el caso de la fosfolipasa citosólica,  $\text{cPLA}_2$ , todos los pacientes analizados tienen ARNm específico de dicha enzima. Si comparamos los niveles de expresión (Figura 27.A), los pacientes asmáticos presentan una mayor expresión que los sujetos con BE (4,5 veces más), estando también por encima de los valores observados en los sujetos sanos, aunque no implican significación estadística.



**Figura 27. Expresión génica relativa de las enzimas de la ruta de la PGE<sub>2</sub> en eosinófilos de sangre periférica.** Las gráficas expresan los valores medios  $\pm$  SD de expresión respecto al grupo control. **A:** cPLA<sub>2</sub>, **B:** COX-1 y COX-2, **C:** 15-PGDH y PGES.

El siguiente paso en la ruta enzimática, ya específico de la síntesis de prostaglandinas, es el análisis de las ciclooxygenasas, tanto la constitutiva (COX-1) como la inducible (COX-2). Los tres grupos de estudio presentan valores similares, estando ligeramente disminuida la expresión de ambas enzimas en el grupo de asma.

Finalmente, respecto a la enzima de degradación (15-PGDH), el grupo de BE presenta niveles similares a los del grupo control, y el grupo asmático ligeramente inferiores (Figura 27.C). La PGES se encuentra disminuida tanto en asma como en BE (3,9 y 2,9 veces, respectivamente frente al grupo control).

Así, observando los niveles de expresión de las enzimas implicadas en el primer paso de la producción de PGE<sub>2</sub>, los eosinófilos de sangre periférica de los individuos con BE parecen actuar más a través de la fosfolipasa secretada que mediante la citosólica, siendo mayor la expresión de esta última en los eosinófilos de los pacientes asmáticos. En el grupo de BE, tanto la

ciclooxigenasa constitutiva como la inducible se encuentran más elevadas que en los grupos control y asma, estando en este último disminuida la expresión de dichas enzimas. Sin embargo, a pesar de estos niveles incrementados, tanto en los eosinófilos de los pacientes con BE como en los eosinófilos de los pacientes con asma, se observan niveles bajos de la enzima de síntesis. La enzima de degradación se encuentra disminuida en el grupo de asma, siendo su nivel de expresión en BE similar al observado en el grupo control.

Por tanto, los eosinófilos de sangre periférica no parecen actuar como fuente primordial de la  $\text{PGE}_2$  dado que, aunque existen variaciones entre los grupos de estudio, estas diferencias son leves y con niveles de expresión bajos. Además, la muestra de estudio, al encontrarse en torrente circulatorio y no en el foco inflamatorio, no explicaría esos mayores niveles de  $\text{PGE}_2$  encontrados en el sobrenadante del esputo del grupo con BE.

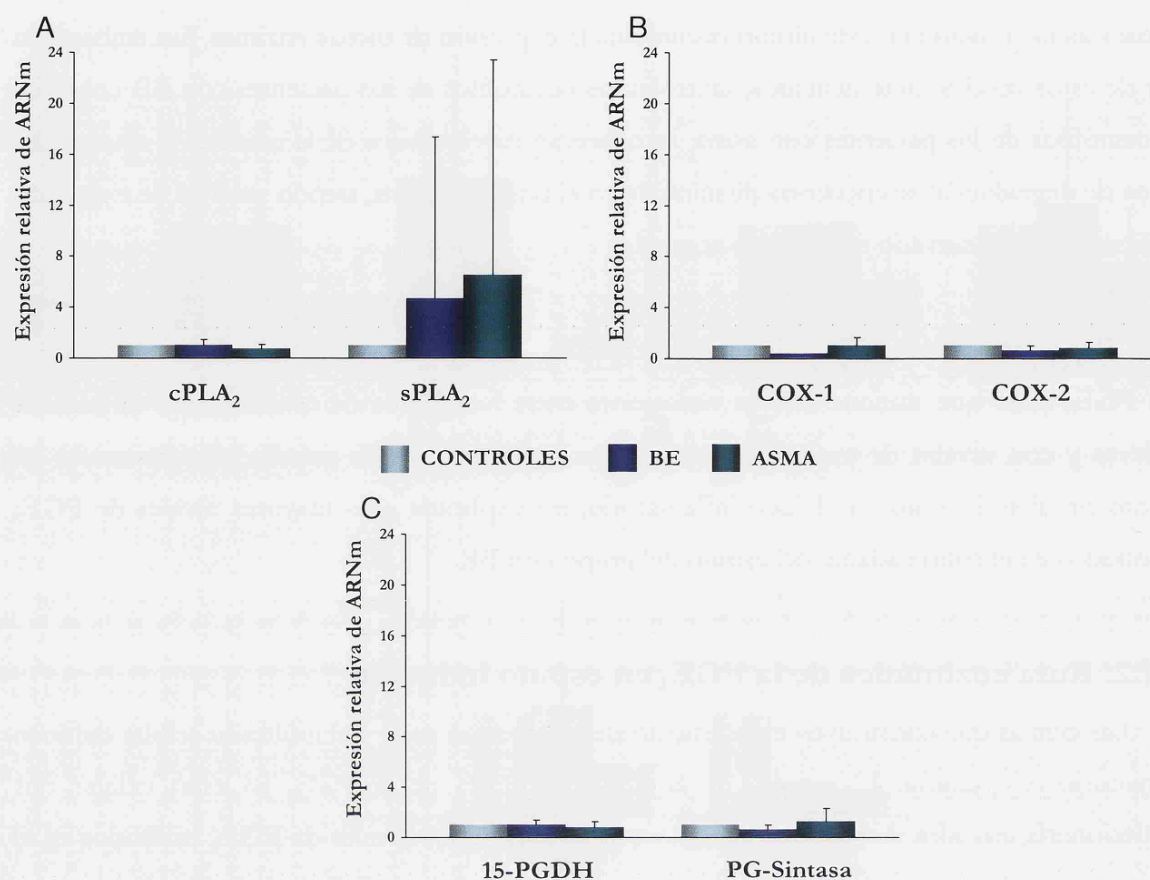
#### 4.7.2. Ruta enzimática de la $\text{PGE}_2$ en esputo inducido

Las células que constituyen el sedimento del EI forman parte del infiltrado celular del foco inflamatorio, el pulmón. El estudio de la ruta enzimática de la  $\text{PGE}_2$  en estas células nos proporcionaría una idea de su contribución en la síntesis de los niveles de  $\text{PGE}_2$  evaluados en el sobrenadante del esputo inducido.

A diferencia de lo observado en los eosinófilos de sangre periférica, en la muestra de esputo inducido todos los grupos de estudio expresan las dos fosfolipasas evaluadas, presentando un patrón de expresión diferente: mientras que los niveles de  $\text{cPLA}_2$  son muy similares en los tres grupos, la fosfolipasa secretada se encuentra muy elevada tanto en BE como en asma (Figura 28.A), estando expresada 4,7 y 6,5 veces más respectivamente que los controles, aunque estas diferencias no alcanzan la significación estadística.

Tanto COX-1 como COX-2 se expresan de forma similar en los tres grupos de estudio (Figura 28.B), con variaciones muy ligeras que no tienen relevancia biológica ni estadística.

En el último tramo de la ruta de síntesis, los tres grupos presentan niveles prácticamente idénticos de la 15-PGDH, siendo similares también en el caso de la PGES, con un ligero incremento sin significación estadística en el grupo de asma (Figura 28.C).



**Figura 28.** Expresión génica relativa de las enzimas de la ruta de la PGE<sub>2</sub> en EI. Las gráficas expresan los valores medios  $\pm$  SD de expresión respecto al grupo control. **A:** cPLA<sub>2</sub> y sPLA<sub>2</sub>, **B:** COX-1 y COX-2, **C:** 15-PGDH y PGES.

La ruta enzimática de síntesis de la PGE<sub>2</sub> en la muestra de EI no parece estar incrementada a nivel génico, ni en el grupo de BE ni en el de asma si lo comparamos con el grupo de individuos sanos, dado que la enzima de inicio específica de las prostaglandinas se encuentra por debajo de los niveles del grupo de referencia o control y no existiendo, además, ninguna variación estadísticamente significativa en el resto de la cascada enzimática.

#### 4.7.3. Ruta enzimática de la PGE<sub>2</sub> en biopsias bronquiales

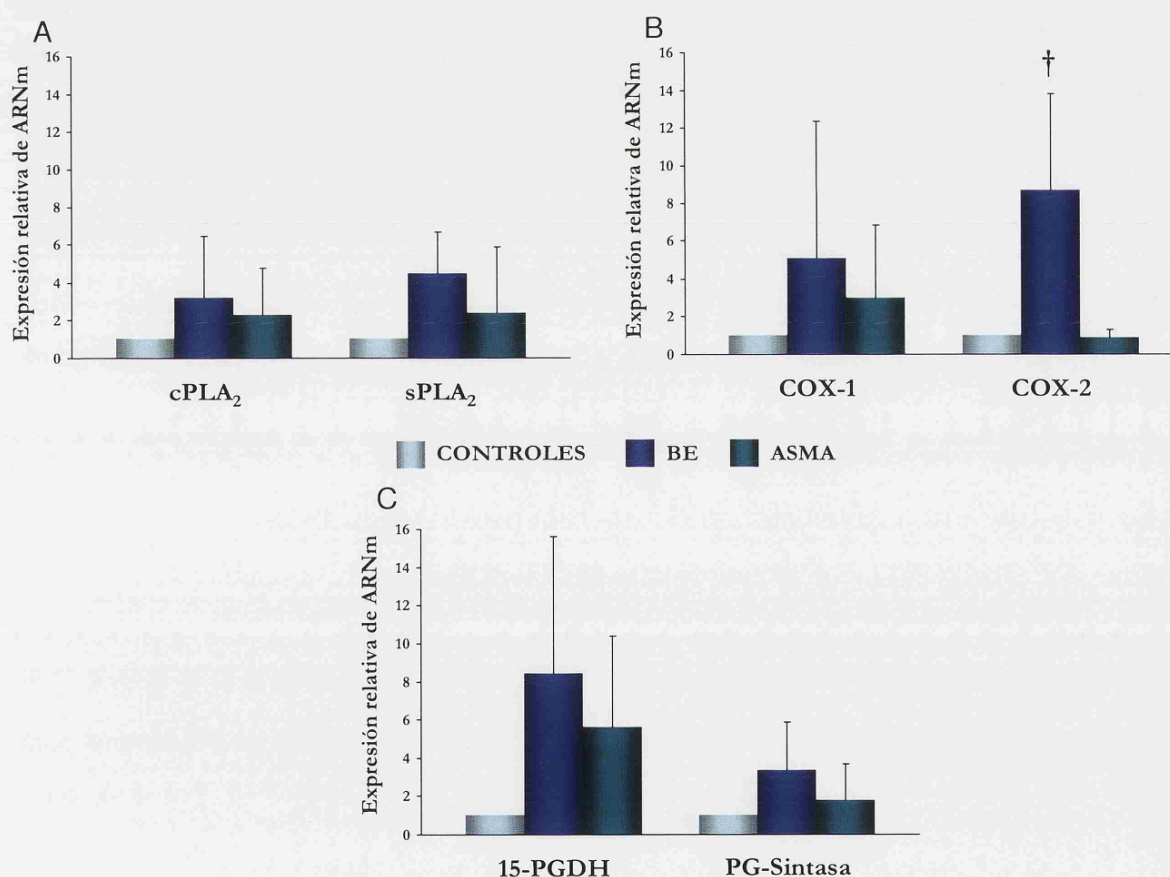
Finalmente, se evaluaron los niveles de las distintas enzimas de la ruta de síntesis de la PGE<sub>2</sub> en muestras de biopsias bronquiales. En este tipo de material sólo se dispuso de un número reducido de muestras de cada grupo: dos muestras en el grupo control (sujetos con patología oncogénica pero sin enfermedades respiratorias, perteneciendo la muestra al área de resección sana), cuatro de individuos con BE y dos del grupo de asma.



El análisis de la ruta enzimática en las biopsias bronquiales mostró un aumento importante de todas las enzimas, tanto en el grupo de asma como en el de individuos con BE, aunque es en este último donde el incremento generalizado de toda la ruta es más relevante (Figura 29).

Las dos fosfolipasas, secretada y citosólica, están elevadas en BE y asma al comparar sus niveles con los de los controles: en la citosólica 3,21 y 2,29 veces, y en la secretada, 4,47 y 2,37 veces respectivamente (Figura 29.A).

En relación a las dos ciclooxygenasas, el perfil de expresión varía entre las dos patologías: la ciclooxygenasa constitutiva (COX-1) se encuentra incrementada en los dos grupos de enfermedad frente a los individuos sanos (Figura 29.B). Sin embargo, al analizar la COX-2 (ciclooxygenasa inducible), el grupo de pacientes asmáticos presenta niveles similares a los del grupo control, mientras que en la BE el incremento en la expresión supone 8,67 y 10 veces, la expresión observada en los sujetos sanos y los asmáticos respectivamente, alcanzando la significación estadística con respecto al grupo de asma ( $p=0,0037$ ).



**Figura 29. Expresión génica relativa de las enzimas de la ruta de la PGE<sub>2</sub> en biopsias bronquiales.** Las gráficas expresan los valores medios relativos de expresión  $\pm$  SD respecto al grupo control. **A:** cPLA<sub>2</sub> y sPLA<sub>2</sub>, **B:** COX-1 y COX-2, con significación estadística del grupo con BE frente a controles sanos (\* $p<0,05$ ) y asma ( $\dagger p<0,01$ ), **C:** 15-PGDH y PGES.

Con respecto a las enzimas de síntesis y degradación, mostradas en la Figura 29.C, tanto en BE como en asma se observan niveles de expresión mayores que en el grupo de referencia (grupo controles sanos), siendo estos niveles superiores en el grupo de BE para ambas enzimas.

El análisis de la ruta enzimática de síntesis de la  $\text{PGE}_2$  en las biopsias bronquiales, pese a tener una muestra por grupo muy pequeña, revela un incremento generalizado de toda la vía enzimática, siendo este aumento mayor en el grupo de BE, lo que podría explicar los niveles superiores de  $\text{PGE}_2$  observados en el sobrenadante del esputo de estos pacientes (Figura 25.B, apartado 4.6).

## **4.8. EVALUACIÓN DE LOS RECEPTORES DE LA $\text{PGE}_2$**

Como se ha mostrado en apartados previos, los niveles de  $\text{PGE}_2$  así como el ratio  $\text{LTC}_4/\text{PGE}_2$  constituyen dos puntos clave con respecto a la diferenciación entre pacientes con patología asmática y BE. Además la  $\text{PGE}_2$ , en función del receptor a través del cual actúe, ejercerá unas acciones u otras.

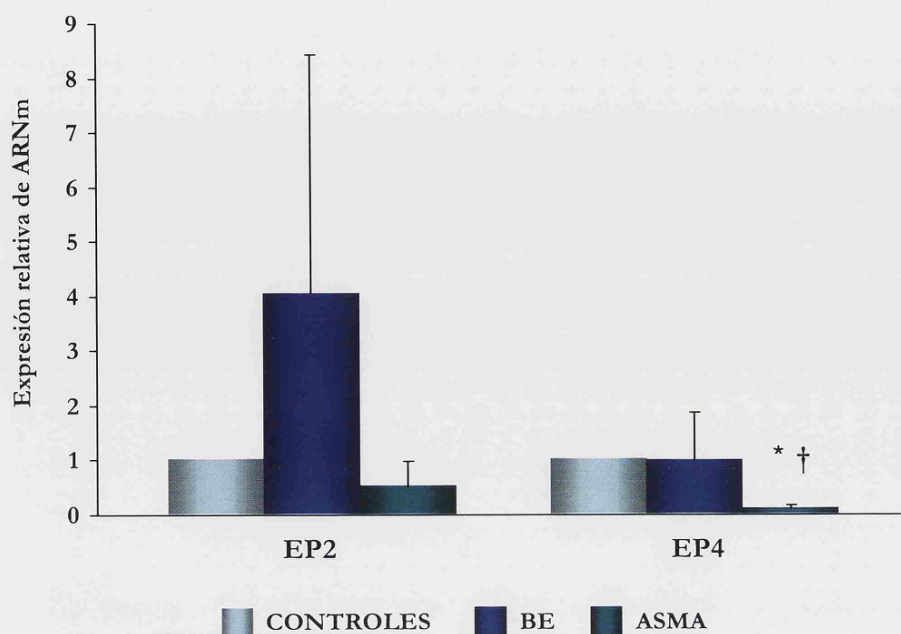
Los receptores EP2 y EP4 de la  $\text{PGE}_2$  median importantes efectos protectores en diversas patologías. Por ello, se decidió analizar la expresión de dichos receptores, tanto a nivel génico como a nivel proteico (este último sólo en eosinófilos de sangre periférica), para ver si existen diferencias en relación a ambos receptores entre los diferentes grupos de pacientes en tres muestras distintas: los eosinófilos de sangre periférica, el sedimento del EI y las muestras de biopsias bronquiales.

### **4.8.1. Evaluación a nivel génico de los receptores de la $\text{PGE}_2$**

#### **4.8.1.1. EOSINÓFILOS DE SANGRE PERIFÉRICA**

Según Mita y colaboradores, los eosinófilos de sangre periférica no expresan los receptores EP1 y EP3 de la  $\text{PGE}_2$ <sup>[167]</sup>. Sin embargo, puesto que existen otros grupos que sí los describen<sup>[168]</sup>, se decidió analizar los niveles de expresión de los cuatro receptores de esta prostaglandina para, por un lado, confirmar la existencia o no de EP1 y EP3 en este tipo celular y, por otro, ver si existen diferencias entre los tres grupos de estudio.





**Figura 30. Expresión génica relativa de los receptores EP2 y EP4 en los eosinófilos de sangre periférica.**

La gráfica muestra la expresión media relativa  $\pm$  SD de EP2 y EP4 en relación a los niveles de expresión observados en el grupo de individuos de referencia (grupo control), existiendo significación estadística para EP4 entre el grupo de asma y los otros dos grupos de estudio (\* $p < 0,05$  vs controles, † $p < 0,05$  vs BE).

Al analizar los receptores de la  $PGE_2$  en los eosinófilos de sangre periférica, se observa un comportamiento diferente entre los individuos de las dos patologías (Figura 30).

En el caso del receptor EP2, destaca su elevada expresión en los pacientes con BE, con niveles muy superiores a los observados en los sujetos sanos (4 veces más), mientras que en los individuos asmáticos se obtuvieron niveles de expresión ligeramente inferiores a los obtenidos en el grupo control.

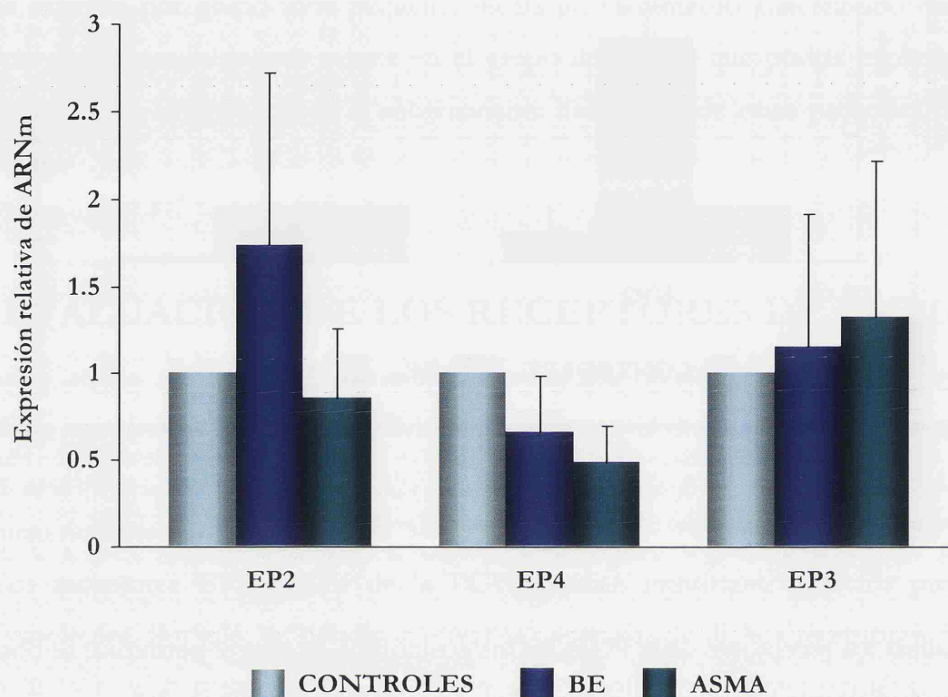
Respecto al EP4, el grupo de BE es prácticamente idéntico al grupo control, siendo el grupo de asma el que presenta una expresión disminuida, existiendo significación estadística tanto con el grupo de individuos sanos como con el de BE ( $p < 0,05$ ).

No se detectó expresión de EP1 ni EP3 en ninguno de los tres grupos.

En resumen, el grupo de pacientes con BE posee altos niveles de EP2 en los eosinófilos de sangre periférica (aunque sin significación estadística) respecto a los otros dos grupos del estudio, mientras que los individuos asmáticos expresan bajos niveles tanto de EP2 como de EP4. Esos valores incrementados para el receptor EP2 en el grupo de BE podrían sugerir que es mediante dicho receptor a través del cual actuaría la  $PGE_2$  en este tipo celular.

#### 4.8.1.2. ESPUTO INDUCIDO

El sedimento del EI forma parte del infiltrado celular del foco inflamatorio, estando constituido por múltiples tipos celulares. Dado que el estudio se realiza con la muestra completa, la expresión observada no podemos asociarla con ninguna población concreta.



**Figura 31.** Expresión génica relativa de los receptores EP2, EP4 y EP3 en el sedimento celular del EI. La gráfica muestra la expresión media relativa  $\pm$  SD de los tres receptores en relación a los niveles de expresión observados en el grupo de individuos de referencia o grupo control.

Ninguno de los tres grupos expresaron el receptor EP1, siendo la expresión de EP3 prácticamente idéntica en los tres grupos.

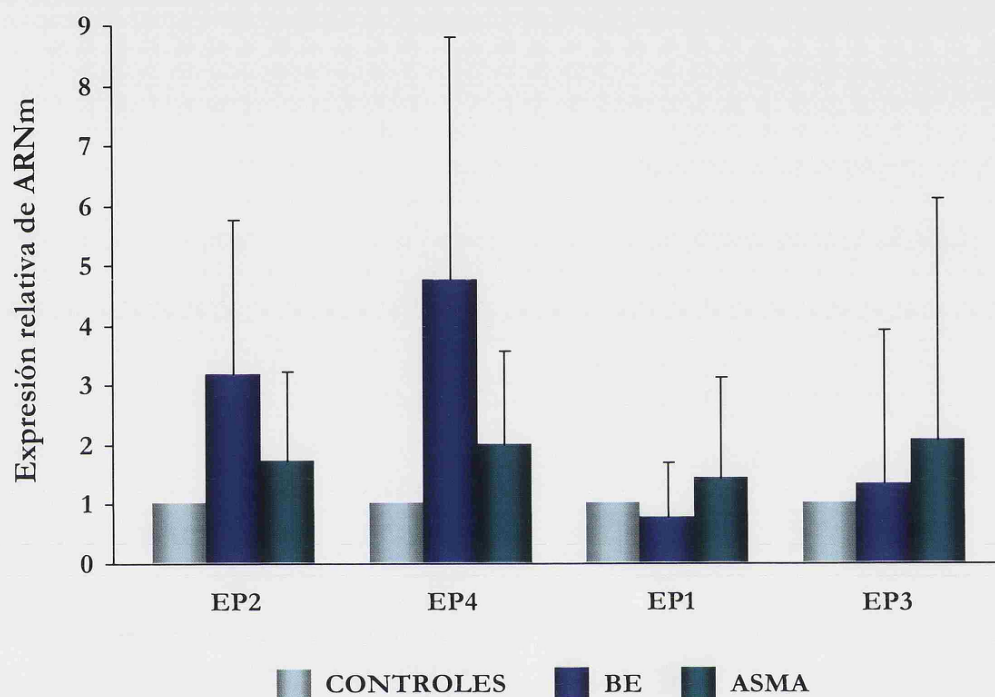
La expresión de EP2 en BE es superior a los otros dos grupos, mientras que en asma se detectaron niveles similares a los de los controles.

En relación a EP4, tanto en asma como en BE, los niveles de expresión se encuentran ligeramente disminuidos al compararlos con el grupo de referencia o control (Figura 31), aunque esta disminución no alcanza la significación estadística.

En la muestra de EI, al igual que en el análisis de la expresión génica en los eosinófilos de sangre periférica, los pacientes con BE presentan una mayor expresión de EP2, lo que podría implicar que la actuación de la  $PGE_2$  en los individuos con esta patología es a través de este receptor.

#### 4.8.1.3. BIOPSIAS BRONQUIALES

Del mismo modo que en el estudio de la ruta enzimática de síntesis de la  $PGE_2$ , también se decidió evaluar los niveles de expresión de los receptores de dicha prostaglandina en muestras de biopsias bronquiales ya que, los mismos tipos celulares que actúan como productores de la  $PGE_2$ , pueden ser la célula diana de los efectos de dicha prostaglandina. Estos efectos dependerán del receptor a través del cual actúe la misma.



**Figura 32. Expresión génica relativa de los receptores de la  $PGE_2$  en las muestras de biopsias bronquiales.** La gráfica muestra la expresión media relativa  $\pm$  SD de los cuatro receptores en relación a los niveles de expresión obtenidos en el grupo de individuos sanos (grupo de referencia).

A diferencia de los tipos de muestra evaluados anteriormente (eosinófilos de sangre periférica y EI), en las biopsias bronquiales de todos los individuos del estudio se detectó expresión de los cuatro receptores de la  $PGE_2$  (Figura 32).

Tanto en el caso del receptor EP2 como en el de EP4, en los pacientes con BE los niveles de expresión génica son muy superiores a los observados en el grupo control y asma (3,18 y 1,85; 4,75 y 2,38 veces, respectivamente).

En relación a EP1, los tres grupos de individuos poseen una expresión similar; en el caso de EP3, aunque los niveles génicos son también similares, el grupo de pacientes asmáticos presenta una expresión ligeramente superior (Figura 32).



En las biopsias bronquiales, se detectó una mayor expresión de los receptores EP2 y EP4 de la PGE<sub>2</sub> en el grupo de BE, mientras que es en el grupo de asma donde los receptores EP1 y EP3 están ligeramente más expresados.

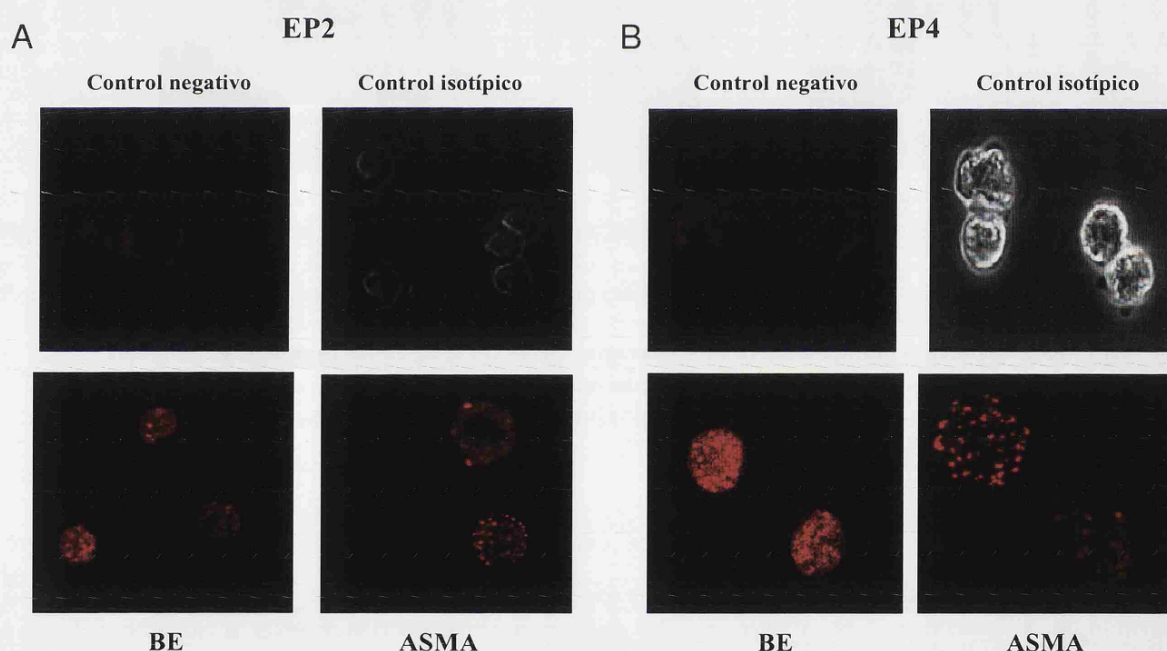
#### 4.8.2. Expresión a nivel proteico de los receptores de la PGE<sub>2</sub>

Tras los resultados obtenidos en la evaluación de los receptores de la PGE<sub>2</sub> a nivel génico, se decidió confirmar dicho patrón de expresión en los eosinófilos de sangre periférica.

Esta aproximación se realizó tanto de forma cualitativa, mediante el uso de microscopía confocal, como de forma cuantitativa, a través de la técnica de la citometría de flujo.

##### 4.8.2.1. MICROSCOPIA CONFOCAL

La primera aproximación fue la evaluación cualitativa de los receptores EP2 y EP4 en los eosinófilos de diversos pacientes del estudio. Se confirmó la presencia de ambos receptores mediante el uso de la microscopía confocal.



**Figura 33. Expresión de los receptores EP2 y EP4 en la superficie de los eosinófilos de sangre periférica de pacientes con BE y asma.** Las imágenes de microscopía confocal muestran la expresión cualitativa del receptor EP2 (A) y EP4 (B) en la membrana de los eosinófilos (ejemplo representativo).

Como se muestra en la Figura 33, tanto los pacientes con BE (imagen inferior izquierda en ambos casos, A y B) como los pacientes con patología asmática (imagen inferior derecha en la Figura 33.A y 33.B), presentan en su superficie marcaje específico para los receptores EP2 y EP4

de la  $PGE_2$ , apreciándose una mayor intensidad en los eosinófilos de pacientes con BE que en los pacientes asmáticos para el receptor EP4, lo que implica un mayor número de receptores en esta célula.

Así, cualitativamente, ambos receptores se detectan en la superficie de los eosinófilos en pacientes de ambas patologías, pareciendo existir una mayor expresión en BE.

#### 4.8.2.2. CITOMETRÍA DE FLUJO

La aproximación cuantitativa se realizó mediante la técnica de la citometría de flujo y el uso de anticuerpos específicos para los receptores de interés marcados con fluorocromos. Se evaluó el porcentaje de eosinófilos de sangre periférica, tanto de pacientes con asma como con BE, que expresaban estos receptores en su membrana.

Tras analizar diversos pacientes asmáticos ( $n=7$ ) y con BE ( $n=5$ ), se observó que estos últimos presentaban una mayor intensidad de fluorescencia, lo que implica un mayor número de receptores en superficie.

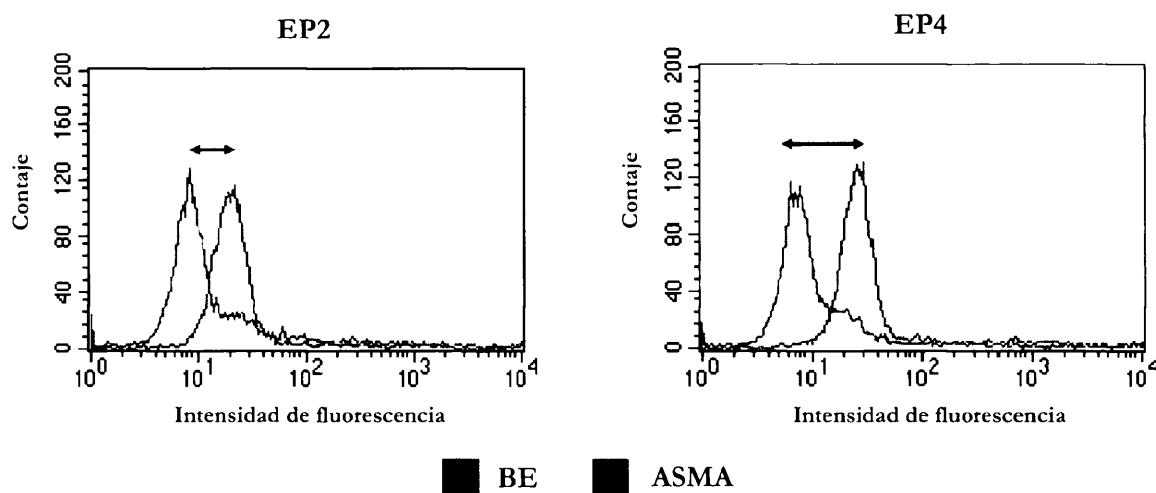


Figura 34. Histogramas del análisis de los receptores EP2 y EP4 en la superficie de eosinófilos de sangre periférica (ejemplo representativo).

Este incremento del porcentaje de expresión en los pacientes con BE respecto a los pacientes asmáticos es estadísticamente significativo ( $p<0,05$ ) en el caso del receptor EP2 (Figura 35) aunque, en los pacientes con BE, para ambos receptores se observa un desplazamiento hacia la derecha de la intensidad de fluorescencia (Figura 34).

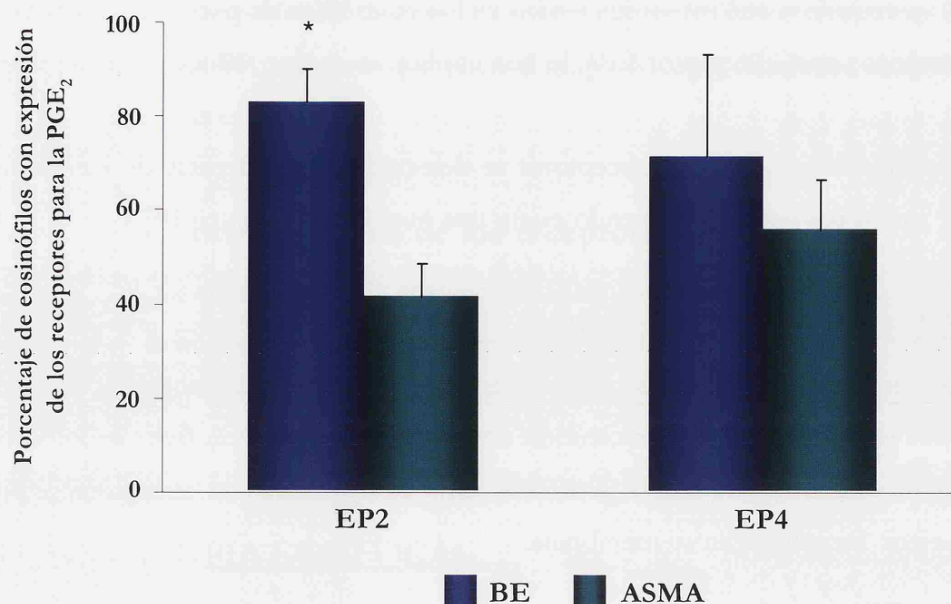


Figura 35. Evaluación de la expresión de los receptores EP2 y EP4 en eosinófilos de sangre periférica mediante citometría de flujo. Los valores representados en la gráfica corresponden a la media  $\pm$  SE del porcentaje de expresión de los receptores EP2 y EP4 en los eosinófilos purificados de sangre periférica (\* $p < 0,05$  vs asma).

Así, tanto a nivel cualitativo como cuantitativo, en los pacientes con BE se constató un mayor porcentaje de eosinófilos positivos para la expresión en su superficie de los receptores EP2 y EP4.

## 4.9. ACTUACIÓN DE LA $PGE_2$ SOBRE LA APOPTOSIS EOSINOFÍLICA

### 4.9.1. Efectos del sobrenadante del esputo inducido sobre la apoptosis de eosinófilos purificados de sangre periférica

Un aspecto importante en la patología respiratoria es la supervivencia de las células efectoras. Así, mediante el uso del sobrenadante del esputo de los pacientes con BE y asma, se evaluó el efecto de los diversos factores presentes en el foco inflamatorio sobre la apoptosis eosinofílica.

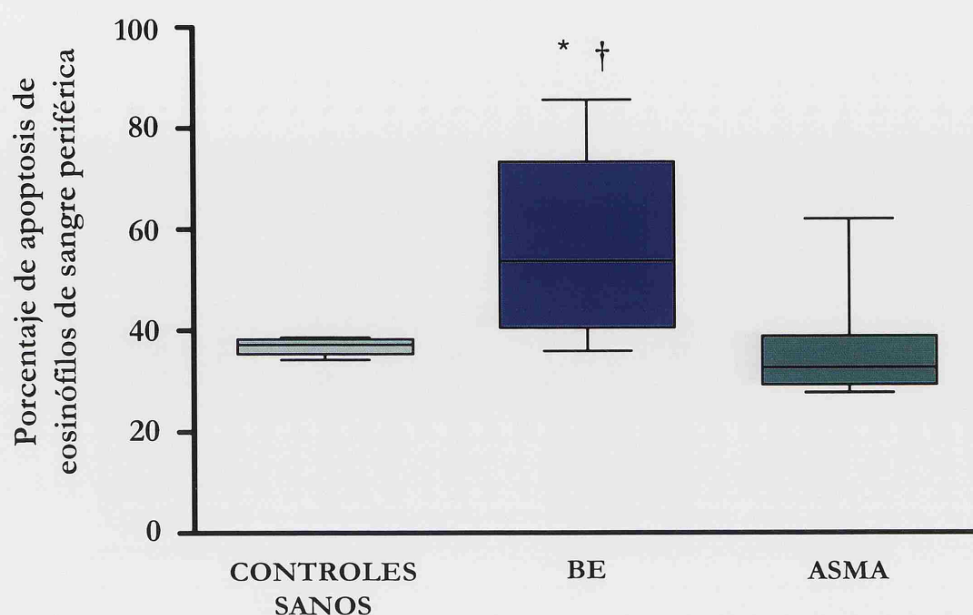


Figura 36. Porcentaje de eosinófilos cultivados con sobrenadantes del esputo de pacientes de los distintos grupos de estudio. La gráfica representa los valores medios  $\pm$  SD (\* $p < 0,05$  vs controles, † $p < 0,05$  vs asma) de los distintos ensayos realizados.

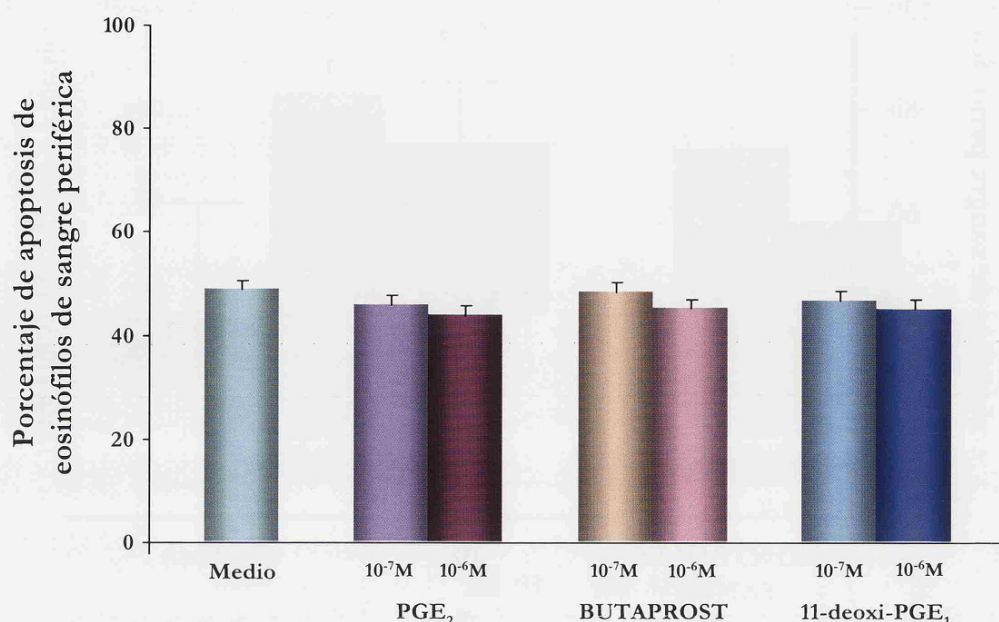
Al hacer el promedio de los ensayos realizados ( $n=10$  para los sobrenadantes de esputo de cada grupo de estudio), se observó un importante incremento de la apoptosis en el caso de los eosinófilos incubados con los sobrenadantes de esputo de pacientes con BE (56,24%; Figura 36), siendo este incremento estadísticamente significativo tanto en relación con los ensayos realizados con el sobrenadante de pacientes con asma (36,36% de apoptosis) como con los de los individuos control (36,81% de apoptosis;  $p < 0,05$  en ambos casos).

Al añadir a los eosinófilos los sobrenadantes del esputo de individuos diagnosticados de asma, el índice apoptótico se mantuvo igual que en el caso de los eosinófilos incubados con el sobrenadante de sujetos sanos.

#### 4.9.2. Efectos de la $PGE_2$ sintética y agonistas sobre la apoptosis de eosinófilos purificados de sangre periférica

Debido a los resultados obtenidos en los ensayos de apoptosis eosinofílica con los sobrenadantes de esputo, se decidió evaluar el efecto específico de la  $PGE_2$  sobre la apoptosis eosinofílica, utilizando para ello cultivos de eosinófilos purificados de sangre periférica incubados con  $PGE_2$  o agonistas sintéticos ( $n=10$  para cada punto de estudio) y analizando los resultados mediante citometría de flujo.





**Figura 37. Porcentaje de apoptosis de eosinófilos purificados de sangre periférica de pacientes del estudio incubados con PGE<sub>2</sub> y agonistas de los receptores EP2 y EP4.** Los valores reflejados representan los valores medios  $\pm$  SE del porcentaje de apoptosis de los ensayos realizados ( $n=10$ ). Claramente se observa que no existe ningún tipo de efecto de la PGE<sub>2</sub> y sus agonistas sobre la apoptosis eosinofílica.

Como se observa en la Figura 37, los porcentajes de apoptosis que se producen con las distintas condiciones son muy similares, no existiendo variación entre dichos porcentajes con respecto al control negativo (eosinófilos cultivados sólo con el medio de cultivo).

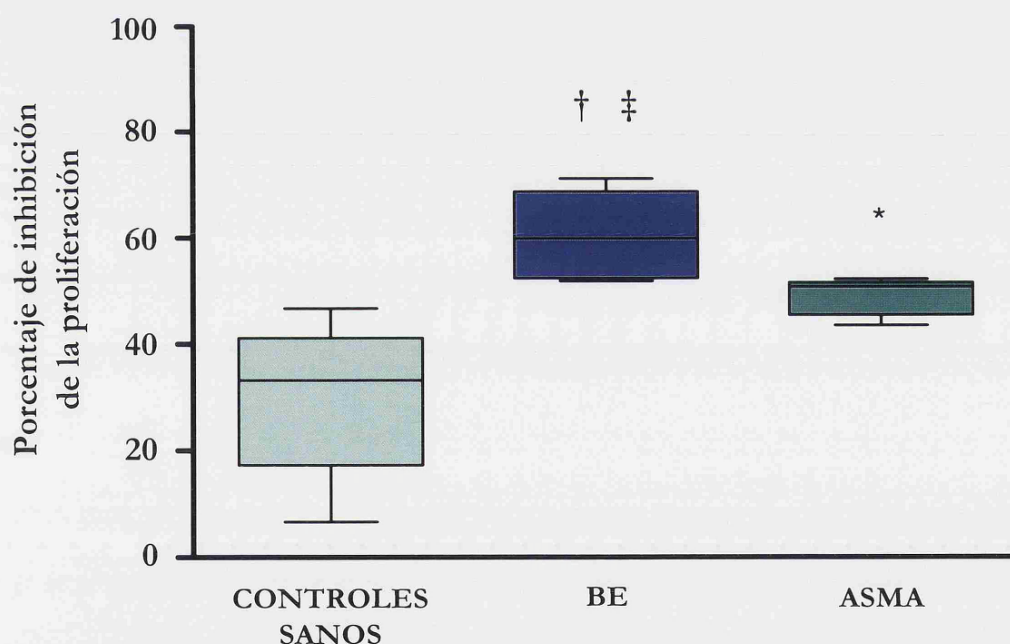
Aunque es evidente el importante incremento de la apoptosis eosinofílica con los sobrenadantes de los pacientes con BE, este efecto no podemos afirmar que sea exclusivamente por la presencia de mayores niveles de PGE<sub>2</sub> en estos sobrenadantes, a tenor de los resultados obtenidos en los ensayos con la PGE<sub>2</sub> sintética y los agonistas de sus receptores.



## 4.10. EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA PGE<sub>2</sub> SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS BRONQUIALES (CMLB)

### 4.10.1. Inhibición de la proliferación de las CMLB: ensayos con los sobrenadantes del esputo inducido

La hiperplasia de las células musculares lisas bronquiales, así como su hipertrofia, es una de las principales características de la patología asmática. Dada su importancia y repercusión en la clínica de esta enfermedad, y puesto que ha sido una diferencia clásica establecida con la BE, se decidió analizar los efectos del sobrenadante del esputo de los distintos pacientes (muestra representativa del microambiente del foco inflamatorio) sobre dicho aspecto diferencial. Para ello, se utilizaron sobrenadantes del esputo de diversos pacientes del estudio ( $n=6$  para sobrenadantes de esputo de pacientes con BE,  $n=5$  en el caso de sobrenadantes de esputo de pacientes asmáticos y  $n=5$  para los sobrenadantes de esputo de individuos sanos).



**Figura 38.** Inhibición de la proliferación de las CMLB en cultivo con los sobrenadantes de pacientes. Los valores de la gráfica reflejan los porcentajes de inhibición de la proliferación alcanzados en los cultivos de CMLB con los sobrenadantes del esputo de individuos con patología asmática, BE e individuos sanos (Media  $\pm$  SD; \* $p<0,05$  asma *vs* controles sanos, † $p<0,05$  BE *vs* asma, ‡ $p<0,01$  BE *vs* controles sanos).

Los distintos sobrenadantes de esputo de los pacientes con BE ejercen un importante efecto inhibitorio sobre la proliferación de las CMLB (Figura 38), existiendo significación

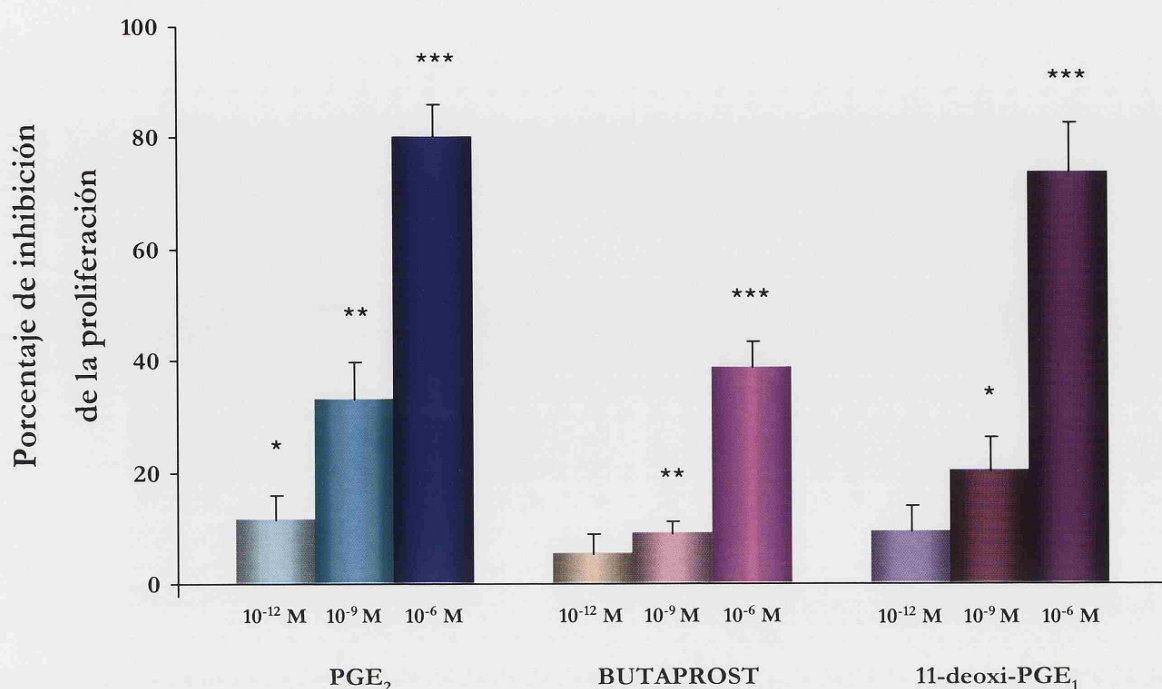
estadística tanto con el grupo control (sobrenadantes de esputo de sujetos sanos) como con los ensayos de las CMLB cultivadas con los sobrenadantes de esputo de los pacientes asmáticos ( $p < 0,01$  y  $p < 0,05$  respectivamente; Figura 38).

En este caso, también existe significación estadística entre los ensayos con los sobrenadantes de esputo de pacientes asmáticos y los de los individuos control ( $p < 0,05$ ), aunque la inhibición conseguida es menor que con los sobrenadantes de esputo del grupo de BE (29,99% con los controles y 48,92% con el sobrenadante de esputo de pacientes asmáticos).

Estos resultados sugieren que elevados niveles de  $PGE_2$  (de forma independiente o potenciada por otros factores presentes en el sobrenadante del esputo) podrían estar ejerciendo un efecto protector en la bronquitis eosinofílica al disminuir o frenar el crecimiento anormal de las células musculares lisas bronquiales.

### **4.10.2. Inhibición de la proliferación de CMLB: ensayos con $PGE_2$ sintética, agonistas de EP2 y EP4 y antagonistas de EP1, EP2 y EP4.**

A la luz de los resultados obtenidos al analizar los efectos de los diversos sobrenadantes de esputo, se decidió confirmar si los efectos observados se debían a la actuación de la  $PGE_2$ . Para ello, se realizaron cultivos de células musculares lisas bronquiales (Bronchial Smooth Muscle Cells, Cambrex Bio Science, Karlskoga, Suecia) y se evaluó su porcentaje de proliferación al incubarlas con distintas concentraciones de  $PGE_2$  comercial, agonistas de los receptores EP2 y EP4 y antagonistas de los receptores EP1, EP2 y EP4.



**Figura 39. Porcentaje de inhibición de la proliferación de las células musculares lisas bronquiales (CMLB).** Los valores reflejados representan los valores medios  $\pm$  SE del porcentaje de inhibición de los ensayos realizados cultivando las CMLB con los distintos estímulos ( $n=8$ ; \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$  vs control sin estímulo en todos los casos).

Como claramente muestra la Figura 39, tanto la PGE<sub>2</sub> como los agonistas de EP2 y EP4, ejercen un importante efecto inhibitor sobre la proliferación de las CMLB desde la menor dosis probada (10<sup>-12</sup> M). Además, el efecto inhibitorio es dependiente de concentración ya que, a medida que se incrementa la concentración de los estímulos, el porcentaje de inhibición de la proliferación es mayor. De esta forma, la PGE<sub>2</sub>, a la concentración de 10<sup>-9</sup> M (1 nM) genera una inhibición del 33%, mientras que el mismo estímulo a una concentración de 10<sup>-6</sup> M (1  $\mu$ M) alcanza un 80% de inhibición.

En este proceso de inhibición de la proliferación de las células musculares parece que participan ambos receptores, ya que a la concentración de 10<sup>-6</sup> M, la 11-deoxy-PGE<sub>1</sub> (agonista de EP2 y EP4) presenta una inhibición similar a la de la PGE<sub>2</sub> sintética, siendo mayor que la originada por el Butaprost, agonista exclusivo para EP2, a la misma concentración (73,78% vs 38,77, respectivamente).

Para confirmar estos datos, se realizaron ensayos con antagonistas de los receptores EP1, EP2 y EP4. Así, de forma previa a la adición de la PGE<sub>2</sub> sintética, se añadieron los antagonistas para bloquear e impedir la unión de la PGE<sub>2</sub> a estos receptores.

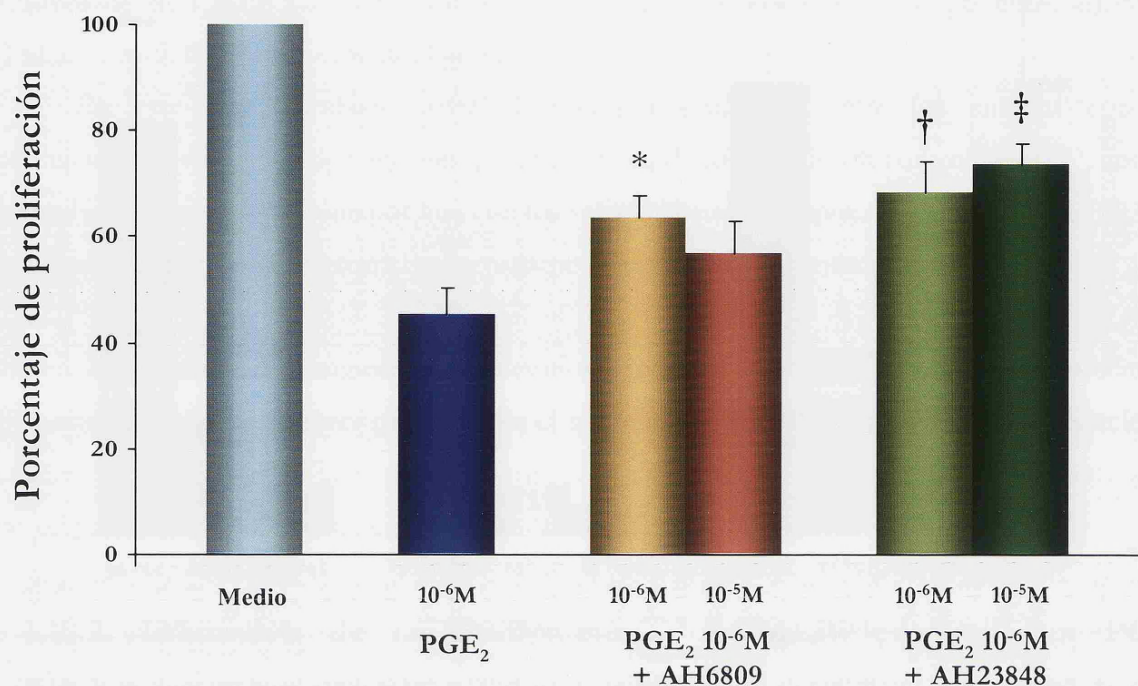
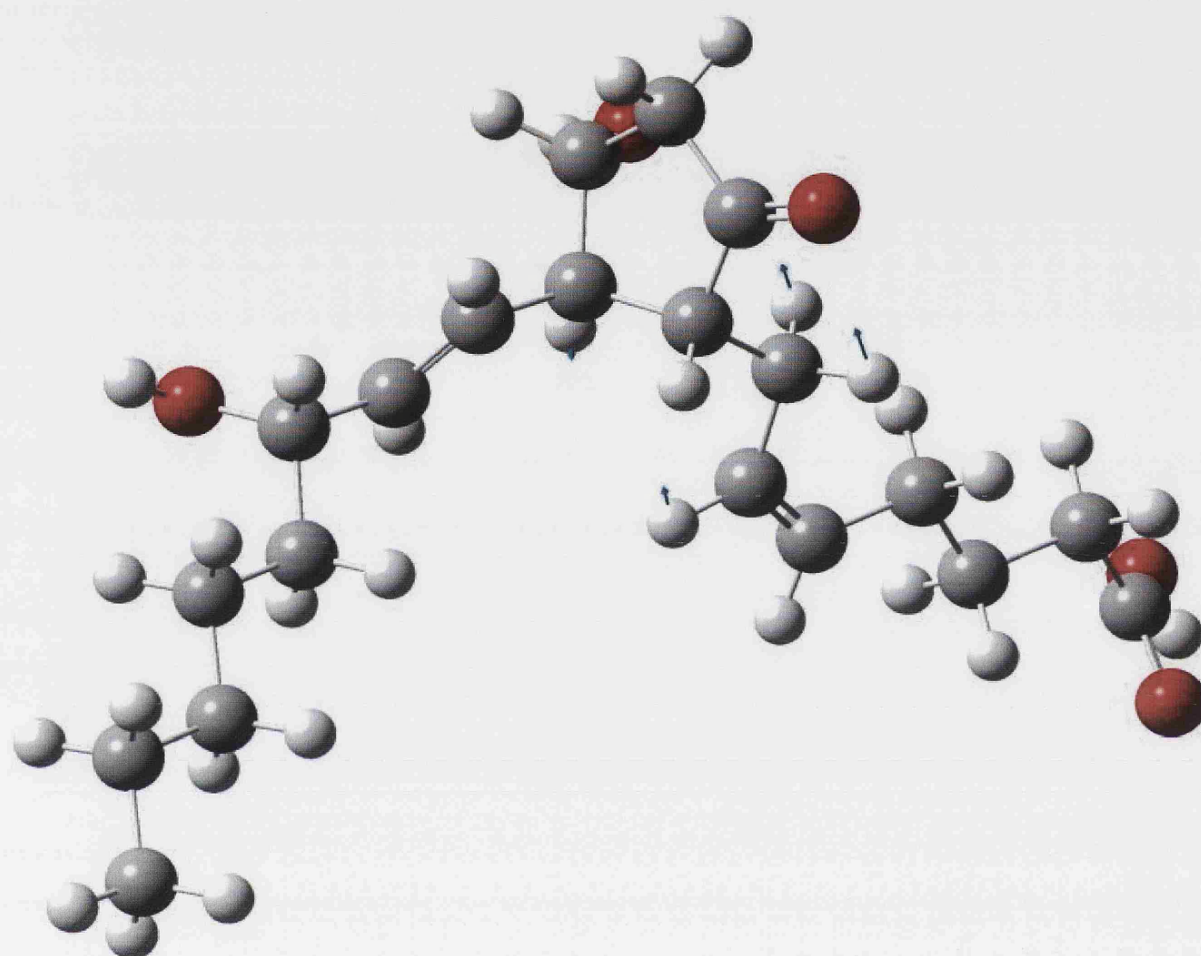


Figura 40. Porcentaje de proliferación de las células musculares lisas bronquiales (CMLB) incubadas con antagonistas de los receptores EP1, EP2 y EP4. Los valores reflejados representan los valores medios  $\pm$  SE del porcentaje de proliferación de las CMLB cultivadas con los distintos estímulos ( $n=12$ ; \* $p<0,05$ , † $p<0,01$ , ‡ $p<0,001$  vs  $\text{PGE}_2$   $10^{-6}\text{M}$ ).

Como se observa en la Figura 40, al bloquear los receptores EP1 y EP2 (AH6809) y EP4 (AH23848), se consigue una recuperación parcial de la proliferación de las CMLB, siendo mayor esta recuperación al utilizar el antagonista exclusivo del receptor EP4, alcanzando significación estadística con las dos concentraciones utilizadas ( $p<0,01$  con  $10^{-6}\text{M}$  y  $p<0,001$  con  $10^{-5}\text{M}$ ). En el caso del antagonista para EP1 y EP2, con ambas concentraciones aumenta el porcentaje de proliferación respecto al porcentaje obtenido con la  $\text{PGE}_2$  a una concentración de  $10^{-6}\text{M}$ , siendo este aumento ligeramente superior con la concentración de  $10^{-6}\text{M}$  ( $p<0,05$ ).

Estos resultados demuestran que la  $\text{PGE}_2$ , a través del receptor EP2 y EP4, es capaz de disminuir o frenar la proliferación de las CMLB, lo que repercutiría en una menor hiperplasia muscular y, por tanto, en una menor obstrucción al flujo aéreo.





## 5. *Discusión*



En la actualidad, se tiene un amplio conocimiento sobre múltiples enfermedades de diversa índole. En los países industrializados o, más comúnmente denominados, países del Primer Mundo, patologías que hace un par de siglos conducían irremediablemente a la generación de epidemias, son hoy controladas de forma sistemática.

El asma, enfermedad crónica del sistema respiratorio de carácter complejo y multifactorial, constituye una de las patologías de mayor incidencia y prevalencia en los países desarrollados, afectando casi a un tercio de la población.

Desde hace más de un siglo, han sido desarrollados numerosos trabajos para intentar elucidar los mecanismos biológicos que intervienen en esta enfermedad. Así, cada año sale a la luz un elevado número de publicaciones aportando nuevos datos sobre diversas características de esta patología que podrían contribuir al desarrollo de nuevas y eficaces terapias. Debido al mayor conocimiento alcanzado sobre los procesos celulares y moleculares que tienen lugar en el asma, así como al perfeccionamiento de las técnicas clínicas utilizadas en el diagnóstico, se han podido definir nuevas entidades patológicas que hace unas décadas habrían sido englobadas como variantes de la patología asmática. Tal es el caso de la bronquitis eosinofílica (BE).

La bronquitis eosinofílica, descrita en 1989 por Gibson y colaboradores, se diferencia claramente del asma por no presentar hiperreactividad bronquial, con resultados de espirometría dentro de los rangos de normalidad<sup>[20]</sup>. Esta ausencia de hiperreactividad de las vías aéreas es un elemento de diferenciación clave entre ambas patologías.

Sin embargo, aunque existen claras diferencias a nivel clínico, el tratamiento es prácticamente el mismo, siendo los corticosteroides inhalados (CI) los fármacos de primera línea en ambos desórdenes respiratorios<sup>[27]</sup>.

La existencia de dos patologías con una clara e importante diferencia fenotípica clínica (presencia o ausencia de hiperreactividad bronquial) pero que responden al mismo tratamiento, llevó a iniciar este estudio (en estrecha colaboración con el Servicio de Alergología de la Fundación Jiménez Díaz-Capio) para “desentrañar” los mecanismos moleculares y celulares diferenciales existentes entre asma y BE y cuál es el origen de la presencia y ausencia de HRB en una patología y otra, respectivamente. Así, estos estudios podrían permitir establecer pautas de tratamiento más específicas.

## 5.1. ELECCIÓN DEL ESPUTO INDUCIDO COMO MUESTRA DE ESTUDIO

Tanto el asma como la BE poseen un importante componente inflamatorio. Dicha inflamación está presente de forma muy localizada en el área pulmonar, siendo su incidencia o reflejo a nivel sistémico menor que el observado en patologías de otra índole. Por ello, un elemento de gran importancia ha sido la elección del esputo inducido (EI) como muestra central del estudio, ya que nos permite acceder al foco inflamatorio, pudiendo evaluar de forma directa el microambiente del órgano diana.

Las primeras aproximaciones metodológicas que surgieron para el estudio *in situ* de la inflamación bronquial fueron el cepillado y lavado broncoalveolar (LBA), así como las broncoscopias. Sin embargo, todas ellas son técnicas invasivas que requieren personal y equipamiento específico no siempre de fácil acceso. Otro inconveniente añadido es que no en todos los pacientes es posible realizar este tipo de técnicas ya que, por ejemplo, la realización de broncoscopias está restringida, básicamente, a pacientes con limitación del flujo aéreo medio o moderado<sup>[169]</sup>, en ningún momento en pacientes con diagnóstico de asma severa. Además, estudios recientes han demostrado que el EI proporciona una información más fidedigna del progreso o estado de la enfermedad en el momento del estudio, que el análisis de biopsias bronquiales o el eNO<sup>[170]</sup>.

En 1992, Isabelle Pin y colaboradores<sup>[154]</sup> emplearon por primera vez y con gran éxito esta técnica para el estudio de la respuesta inflamatoria en asma. Estudios posteriores en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), han confirmado la utilidad del EI en el recuento celular y en el desarrollo de una mejor gestión clínica de los pacientes<sup>[171]</sup>, permitiendo alcanzar un mayor conocimiento sobre la fisiopatología y tratamiento de esta enfermedad<sup>[172]</sup>.

El EI permite conocer el patrón celular existente en el pulmón, pudiendo no sólo monitorizar el conteo celular y reducir así el riesgo global de exacerbaciones<sup>[173]</sup>, sino que también es una herramienta útil para evaluar la efectividad de un tratamiento<sup>[174]</sup>.

En este sentido, numerosos trabajos han focalizado su atención sobre la utilidad del esputo para identificar, como eosinofílica o neutrofílica, la inflamación presente en las vías aéreas de los pacientes. Esto reviste una gran importancia, ya que se ha demostrado que el número de exacerbaciones graves e ingresos hospitalarios es más bajo cuando el tratamiento antiinflamatorio está basado en los resultados obtenidos tras el análisis de la celularidad del EI<sup>[175]</sup>. Esto se ve apoyado por la existencia de una importante asociación entre el carácter eosinofílico de la respuesta inflamatoria y una mayor efectividad del tratamiento con los CI<sup>[23]</sup>. Así, la



monitorización del tratamiento en función del componente eosinofílico optimiza las pautas a largo plazo, identificando y reduciendo el número de exacerbaciones<sup>[175]</sup> pudiendo ayudar, además, a determinar la dosis mínima requerida para tratar de forma adecuada el asma<sup>[176]</sup>.

A la hora de adoptar una técnica con grado de estandarización para un estudio o proyecto (o de forma normalizada en la práctica clínica), dicha técnica tiene que cumplir una serie de requisitos como es el tener una alta reproducibilidad, así como valores de sensibilidad y especificidad elevados. Aunque el uso del EI comenzó a mediados de los años 60, no ha sido hasta más de 30 años después cuando se ha confirmado su reproducibilidad en los estudios con pacientes asmáticos<sup>[177,178]</sup>, ofreciendo además la ventaja de ser un método seguro, con un muy bajo porcentaje de incidencias en el desarrollo de la técnica y, sobre todo, no invasivo. Esta característica de no invasividad la convierte en una técnica de gran valía ya que puede ser llevada a cabo, con un elevado porcentaje de éxito, incluso en individuos con diagnóstico de asma moderado o grave<sup>[150]</sup>, pacientes en los que está desaconsejada la realización de broncoscopias.

Dado que a partir del EI se obtiene tanto un sedimento celular como un componente líquido (sobrenadante), esta técnica permite conocer el patrón celular del infiltrado inflamatorio, así como la composición del medio fluido en el que se encuentran esas células y, por tanto, las características del microambiente del foco inflamatorio, siendo este dato de gran importancia ya que serán los elementos que conforman ese microambiente los que actuarán sobre los tipos celulares que constituyen las estructuras pulmonares.

Sin embargo, existen algunos condicionantes negativos referentes a la técnica de la inducción del esputo. Algunos autores consideran que el proceso de inducción hace que el esputo sea de peor calidad que el obtenido mediante la expectoración espontánea<sup>[154]</sup>. Además, en ocasiones se ha constatado la existencia de pacientes que desarrollan broncoespasmo por inhalación de salino, así como sensibilidad a la metacolina, siendo éstas algunas de las pocas complicaciones que presenta esta técnica<sup>[178]</sup>. En este sentido, el desarrollo de la inducción no se recomienda en pacientes con volúmenes pulmonares bajos o valores de FEV<sub>1</sub> “pobres”, realizándose siempre el protocolo en presencia de un médico y una enfermera o un técnico formado en la técnica<sup>[147]</sup>.

Por tanto el EI, el cual tiene una alta reproducibilidad (intraensayo) y cuya obtención es fácil, segura y rápida, ofrece un amplio abanico de aplicaciones en la práctica clínica, pudiendo considerarse un interesante instrumento para la evaluación y monitorización clínica en patologías respiratorias como el asma, contribuyendo al progreso del conocimiento de los mecanismos y

patrones celulares, así como de los marcadores moleculares existentes<sup>[179]</sup>, convirtiéndose en una técnica de gran valor para el análisis del estado inflamatorio en las patologías objeto de nuestro estudio: la bronquitis eosinofílica y el asma.

A las ventajas aportadas por la técnica del esputo inducido, se suma el hecho del uso de la citometría de flujo para el análisis de las poblaciones celulares, tanto en este tipo de muestra como en sangre periférica. La citometría de flujo permite la evaluación simultánea de un número elevado de células, rentabilizando el tiempo empleado, así como la cantidad de muestra necesaria. Además, la base metodológica en la que se fundamenta utiliza anticuerpos marcados con fluorocromos, existiendo actualmente una amplia oferta de dichos anticuerpos y sus posibles marcadores. Este sistema de marcaje celular posee un mayor grado de sensibilidad respecto a otros sistemas (tinciones con colorantes vitales), permitiendo la evaluación de poblaciones que se encuentran en un porcentaje muy bajo dentro de la totalidad de la muestra, como por ejemplo es el caso de los linfocitos en el esputo<sup>[180]</sup>. Además, al ser una adquisición automática, se incrementa la objetividad en el análisis posterior de las muestras.

En este sentido, Domínguez Ortega y colaboradores<sup>[181]</sup> ya han demostrado la utilidad del análisis del esputo inducido mediante citometría de flujo para evaluar las células inflamatorias en asma.

Así, el esputo inducido (con la importante ventaja de ser una técnica no invasiva) y su análisis por citometría de flujo (metodología rápida y de gran precisión y objetividad), de forma conjunta, constituyen una importante herramienta en el estudio de la inflamación bronquial, elemento característico de las dos patologías de interés, asma y bronquitis eosinofílica.

## **5.2. IgE TOTAL: PARTE DE LA RESPUESTA HUMORAL**

Un aspecto clave del trabajo fue el diagnóstico y la caracterización clínica de los pacientes. La provocación con metacolina (prueba para determinar la existencia o no de hiperreactividad bronquial) ha sido la prueba o protocolo clínico empleado para poder diferenciar entre los pacientes asmáticos y los pacientes con BE, ya que en estos últimos se observa una ausencia de hiperreactividad bronquial.

Se realizó la historia clínica de forma exhaustiva, exploración física, así como pruebas cutáneas en prick para una batería de neuroalérgenos, valorando la existencia o no de atopia; por último, se evaluaron los valores séricos de IgE total, inmunoglobulina clásicamente asociada a los procesos alérgicos.

Como se observa en la Tabla VIII del apartado 4.1, el porcentaje de pacientes atópicos dentro del grupo de BE es inferior al observado entre los pacientes asmáticos, lo que está en concordancia con la literatura<sup>[182]</sup>, aunque en nuestros grupos de estudio la proporción de atopia en el grupo de BE es superior a la existente en la población general. Además, los niveles de IgE sérica total del grupo con BE se encuentran casi dentro del rango de normalidad ( $\text{IgE} < 100 \text{ kU/L}$ ), mientras que en los asmáticos están claramente elevados (Figura 20, apartado 4.3).

Todo esto sugiere que la patogenia de la BE en los pacientes de este estudio no parece estar esencialmente originada por mecanismos mediados por IgE.

### 5.3. DISEÑO DEL ESTUDIO

En una aproximación general, el propósito del estudio fue caracterizar, a nivel celular y molecular, las dos patologías; sólo así, conociendo los parámetros más determinantes, se podrían establecer nuevas vías de actuación terapéutica.

Para lograr esa caracterización se siguieron varias líneas de aproximación, estableciendo distintos niveles de estudio:

- \* **Nivel celular.** Caracterización del patrón celular, tanto a nivel sistémico (sangre periférica) como en el foco inflamatorio (esputo inducido).
- \* **Nivel proteico y lipídico (factores solubles).** Evaluación de los niveles de citocinas, factores pro-inflamatorios y mediadores lipídicos presentes en la fase fluida del esputo inducido.
- \* **Nivel génico.** Determinación de los niveles de expresión de diversas citocinas y factores pro-inflamatorios.

La conjunción de todos estos datos proporcionaría una visión global, pudiendo establecer las diferencias entre ambas patologías de forma más clara.

## 5.4. CARACTERIZACIÓN DEL PATRÓN CELULAR EXISTENTE EN ESPUTO INDUCIDO Y SANGRE PERIFÉRICA

La presencia de eosinófilos en esputo es uno de los parámetros en los que se apoya el diagnóstico de la BE<sup>[33,27]</sup>, estando también dicha característica asociada a la patología asmática.

Los resultados del análisis de la celularidad por citometría de flujo muestran un incremento de eosinófilos en ambas patologías con respecto a los individuos sanos, tanto a nivel sistémico (Tabla IX, apartado 4.2.1) como en el foco inflamatorio (Tabla X, apartado 4.2.2).

En sangre periférica, los niveles de eosinofilia son prácticamente idénticos entre ambos grupos de pacientes; sin embargo, en la muestra de EI, los pacientes con BE presentan un porcentaje ligeramente mayor de eosinófilos respecto al grupo de asma. De esta forma, el fenotipo celular presente en nuestros pacientes está en consonancia con la caracterización celular clásicamente descrita en la literatura. Así, en la patología asmática, el infiltrado de las vías aéreas está principalmente constituido por linfocitos CD4<sup>+</sup> de tipo Th2, mastocitos, basófilos y eosinófilos, siendo estos últimos las principales células efectoras y una importante característica de la fase asmática tardía<sup>[58,42]</sup>. De forma paralela a su actividad como células efectoras, se ha demostrado el relevante papel que los eosinófilos juegan como células accesorias presentadoras de antígeno<sup>[56,183]</sup>. De los datos de la celularidad de los pacientes con BE, se concluye la clara implicación de los eosinófilos en la patogenia de la BE, ya que este subtipo celular está aumentado en los pacientes del estudio con esta patología, en consonancia con lo descrito en la literatura. La presencia de eosinofilia en esputo es, además, uno de los criterios diagnósticos de dicha enfermedad<sup>[1]</sup>.

En la muestra de EI (Tabla X), el patrón de activación de los eosinófilos en los pacientes con BE y los pacientes con asma es diferente (excepto en el caso de CD69 cuyo porcentaje es similar entre ambos grupos). El grado de activación, de forma general, es mayor en los pacientes con BE, aunque representa un porcentaje muy bajo dentro de la celularidad total.

Por otro lado, el análisis de la activación eosinofílica en sangre periférica muestra, entre los individuos con BE y los diagnosticados de asma, un patrón con ligeras modificaciones en el caso de HLA-DR y CD25<sup>+</sup> estando, en este último caso, 6 veces más elevado en BE que en el grupo de asma.

Aunque la activación de los eosinófilos es diferente entre las dos muestras evaluadas y los dos grupos de estudio, el grupo control está por debajo en todos los casos. Los valores de este

grupo control se encuentran dentro de la normalidad y en consonancia con lo obtenido en otros estudios, en la mayoría de los cuales se analiza la activación de los eosinófilos mediante inmunohistoquímica, marcando la forma secretada de la ECP (EG2<sup>+</sup>)<sup>[184]</sup>. Al realizar la evaluación de la activación eosinofílica mediante citometría de flujo y su posterior análisis mediante un software, eliminamos un posible factor de error siendo esto también aplicable al resto de los tipos celulares evaluados por esta técnica.

Los eosinófilos expresan un amplio espectro de marcadores de activación entre los que se encuentran CD69, CD25 (subunidad  $\alpha$  del receptor de la interleucina-2 o p55)<sup>[185]</sup> y HLA-DR. Mientras que CD69 está asociado a una respuesta rápida de activación, CD25 está relacionado con una activación tardía<sup>[186]</sup>, pudiendo esto explicar el hecho de que el CD25<sup>+</sup> esté más incrementado en el esputo inducido (zona diana de la inflamación) que en la muestra de sangre periférica, ya que los eosinófilos presentes en el pulmón habrían sido reclutados de forma posterior desde la circulación sanguínea.

Los eosinófilos purificados no expresan en su superficie CD69 aunque presentan un acúmulo intracelular preformado de este marcador<sup>[187]</sup>; sin embargo, tras ser estimulados por algunas citocinas, como IL-5, IL-3 o GM-CSF, la expresión de CD69 se induce rápidamente (se detecta expresión a la hora de incubación aunque sigue incrementándose hasta 2 días después de la estimulación), requiriéndose la síntesis de proteína. Así, se ha postulado que CD69 podría ser un co-receptor para la activación celular, pudiendo también participar en el proceso de liberación de mediadores así como en la degranulación<sup>[188]</sup>. Además, se ha demostrado que esas mismas citocinas (IL-5, IL-3 y GM-CSF) son capaces de inducir también la expresión en la superficie de los eosinófilos de CD25 hasta 6 días después en un co-cultivo con fibroblastos<sup>[189]</sup>. En este estudio, tras 6 días de co-cultivo de eosinófilos y fibroblastos 3T3, en presencia de GM-CSF e IL-3 recombinantes humanas, observaron que dichas citocinas eran capaces de inducir la expresión de CD25 y CD4 en los eosinófilos en cultivo. Ambas citocinas son producto de linfocitos T activados, por lo que el aumento de CD25 y CD4 en la superficie de los eosinófilos también podría ocurrir *in vivo*, lo que permitiría a los eosinófilos interactuar con células que expresan moléculas MHC de clase II.

Del mismo modo, el incremento de eosinófilos HLA-DR<sup>+</sup>, tanto en los individuos asmáticos como en los pacientes con BE pero no en los sujetos sanos, había sido demostrado previamente<sup>[190,191]</sup>.

Así, el análisis del patrón celular de sangre periférica como del EI, muestra un aumento del porcentaje de eosinófilos en ambas patologías, siendo ligeramente superior este incremento en la BE, lo que confirma que esta subpoblación celular juega un papel importante en la patogenia de estas dos enfermedades. El incremento en el porcentaje de eosinófilos en las muestras de EI de los pacientes con BE podría estar influenciado por la mayor presencia de pacientes no tratados o de nuevo diagnóstico (pacientes “naive”) en este grupo. Existen diversos artículos que confirman esta teoría, encontrando un mayor porcentaje de eosinófilos en el EI de pacientes con broncoconstricción inducida por ejercicio (BIE) sin tratar<sup>[192]</sup>. Este incremento de eosinófilos en condiciones de “no tratamiento”, concretamente con glucocorticoides, también se ha encontrado en muestras de sangre periférica de pacientes con asma y rinitis<sup>[193]</sup>. El diferente perfil de activación de los eosinófilos entre los grupos de enfermos y entre los tipos de muestra estudiados, induce a pensar en un cambio estructural y funcional del eosinófilo en función del microambiente en el que se encuentre (fenómeno de compartimentalización de los eosinófilos activados<sup>[194]</sup>), por lo que dicho entorno ha de ser diferente en las vías aéreas de los asmáticos y en las de los sujetos con BE.

Por otro lado, cabe mencionar el descenso en el porcentaje de macrófagos observado en los individuos de ambas patologías respecto a los individuos sanos en la muestra de EI.

Una posible explicación para esta disminución del porcentaje de macrófagos podrían ser los procesos de modificación en la transcripción génica de factores que modulan la síntesis de diversas citocinas y mediadores inflamatorios y que, a su vez, actúan sobre diversos tipos celulares. Tanto en el asma y BE como en otras patologías respiratorias (EPOC o fibrosis quística) caracterizadas por la presencia de inflamación pulmonar, se requiere la expresión coordinada de múltiples genes inflamatorios que codifican para diversas citocinas, quimiocinas y enzimas que sintetizan mediadores inflamatorios. Dichos genes están regulados por varios factores de transcripción, como el factor nuclear (NF)- $\kappa$ B o la proteína activadora-1 (AP-1). La principal modificación que afecta a la transcripción génica son los procesos de acetilación y deacetilación, los cuales son controlados por las acetiltransferasas de histonas (HATs) y las deacetilasas de histonas (HDACs), las cuales contrarrestan el efecto de las HATs, eliminando el grupo acetilo de las histonas hiperacetiladas y devolviendo la histona a su estado basal, lo que implica la supresión de la transcripción génica<sup>[195]</sup>. Los mecanismos de acetilación están implicados en numerosas funciones celulares entre las que se incluyen la expresión de genes inflamatorios y la proliferación celular. Así, un mayor grado de acetilación implica un aumento de estos procesos<sup>[196]</sup> lo que, en este caso, conllevaría un incremento de la proliferación de

macrófagos. Así, en los pacientes de nuestro estudio, estos procesos de acetilación tal vez están bloqueados y/o excesivamente incrementados los procesos de deacetilación.

Existen estudios sobre la eficacia de los glucocorticoides en la inhibición de la actividad de la acetiltransferasa de histonas (HAT) y en el incremento de los mecanismos de las HDACs que suprimen los procesos de acetilación o los reversionen<sup>[197]</sup>, afectando al reclutamiento celular entre otros procesos. Aunque a los pacientes del estudio se les indicó que retiraran el tratamiento antes de realizar las pruebas y la inducción del esputo (ver apartado 3.1.1), ese menor reclutamiento de macrófagos en el pulmón puede deberse a un efecto residual de los corticosteroides (*per se* o sobre la actividad de la HAT) que, tanto los individuos asmáticos como los pacientes con BE del estudio, hayan podido tomar en un período previo a la realización de la inducción del esputo, o un mal cumplimiento de las indicaciones, factor que se ha demostrado es uno de los principales problemas en el establecimiento de una buena pauta terapéutica.

En este sentido, Hart y colaboradores<sup>[198]</sup> encontraron un número similar de macrófagos entre un grupo de sujetos asmáticos e individuos control durante un periodo de 3 meses con dosis medias de fluticasona, lo que corrobora este efecto del fármaco sobre el porcentaje celular.

Otra posible explicación sería un fallo en el proceso de reclutamiento fagocítico debido a la falta de tiempo para que los monocitos maduren pues, como se observa en la Tabla IX, no se aprecia un aumento de dicho tipo celular en sangre periférica. Además, la actividad fagocítica puede estar siendo ejercida por células fagocíticas no profesionales como son las células epiteliales, las células musculares lisas o las células dendríticas, en lugar de por los macrófagos<sup>[127]</sup>.

Por último, en la muestra de esputo también se observa una reducción del porcentaje de los linfocitos en los individuos con patología al compararlo con el de los individuos sanos (Tabla X). Al igual que en el caso anterior, el no cumplimiento de las recomendaciones dadas a los pacientes antes de la inducción del esputo podría ser la causa de esos porcentajes linfocitarios bajos, ya que uno de los mecanismos a través de los cuales ejercen sus efectos los corticosteroides es la disminución del reclutamiento de las células pro-inflamatorias como son los linfocitos.

De forma normal, el sistema  $\beta_2$ -adrenérgico suprime la actividad de las células T mediante la activación del sistema de la adenilato ciclasa acoplada a proteínas  $G_s$  y la acumulación de AMPc. En este sentido, existen trabajos en los que se corrobora la inhibición ejercida por la ciclesonida (corticosteroide) sobre la migración de las células T, disminuyendo la respuesta asmática tardía<sup>[199]</sup>. En este trabajo de Heijink y colaboradores se demostró que bajas dosis de ciclesonida, además de reducir la movilización o reclutamiento de células T, también disminuyen

la secreción de citocinas tras la exposición o provocación con el alérgeno, pudiendo estar regulada esta inhibición de la migración celular a través de la quimiocina CCL17.

Así, podemos concluir que ambas patologías presentan un perfil similar en relación al infiltrado inflamatorio presente en el pulmón, caracterizado por un importante porcentaje de eosinófilos (ligeramente superior en el grupo de BE) y una disminución tanto en el porcentaje de macrófagos como de linfocitos con respecto al grupo control, grupo cuyo porcentaje está dentro de la normalidad<sup>[162]</sup>.

La ausencia de correlación entre el componente celular inflamatorio y la existencia o no de hiperreactividad bronquial, aunque sorprendente, ya se ha observado en otras poblaciones asmáticas de estudio. Así, en un trabajo realizado en el año 2008 en un grupo de atletas con y sin asma inducido por ejercicio<sup>[200]</sup>, no encontraron una correlación entre el componente y el número de células inflamatorias y la presencia de hiperreactividad bronquial, habiendo sido determinado este hecho con anterioridad<sup>[11,3]</sup>. Además, la disminución de macrófagos en pacientes con patología alérgica respecto a individuos sanos, también fue observada en un estudio de Polosa y colaboradores<sup>[201]</sup> del año 2000, entre sujetos con rinitis alérgica e individuos no alérgicos, por lo que esta diferencia encontrada en este estudio no es una situación excepcional y única, aunque las causas de dicho patrón han de ser todavía clarificadas.

## **5.5. CARACTERIZACIÓN GÉNICA Y PROTEICA DE CITOCINAS EN EL ESPUTO INDUCIDO**

Clásicamente, tanto el asma como la bronquitis eosinofílica se han caracterizado por la presencia de citocinas Th2 como la IL-4, la IL-5 y la IL-13. Estas citocinas producidas por células Th2 orquestan la respuesta a través del efecto que ejercen sobre otras células, como son los eosinófilos, las células B y los mastocitos, o mediante la interacción directa con células estructurales de la zona de la inflamación, en este caso del pulmón. Además, algunas de estas citocinas son capaces de colaborar de forma indirecta en procesos de reclutamiento y degranulación celular a través de la activación de moléculas de adhesión y la producción de quimiocinas. El incremento de estas citocinas pro-inflamatorias contribuye al mantenimiento de un estado inflamatorio perpetuado por el infiltrado celular<sup>[11]</sup>.

Sin embargo, una respuesta Th1 (fundamentalmente representada por IFN- $\gamma$ ) podría inhibir ciertas respuestas atribuibles a la activación de células Th2. Por lo tanto, una disminución de citocinas Th2 y/o el aumento de citocinas Th1 podría generar un cambio hacia una respuesta



de tipo Th1<sup>[202]</sup>, disminuyendo el avance del proceso inflamatorio de tipo Th2. En dicho proceso, también se ha de tener en cuenta el papel regulador de determinadas citocinas como la IL-10.

El análisis génico de las citocinas Th2 en el sedimento celular del esputo (Figura 21, apartado 4.4.) mostró una distribución similar entre el grupo de BE y asma, aunque con sutiles diferencias: mientras que la IL-5 es expresada por el 15,39% de los pacientes con asma frente al 9,09% del grupo de BE, es en esta última patología en la que el porcentaje de pacientes que expresan la IL-13 es mayor.

Esta similitud con respecto a las citocinas Th2 en las patologías de estudio ya había sido observada con anterioridad, tanto a nivel de expresión en la submucosa bronquial como en linfocitos T del lavado broncoalveolar<sup>[31]</sup>, así como en células musculares bronquiales<sup>[203]</sup>, en este último caso con respecto a la IL-5. Estos datos, unidos a los obtenidos en el análisis de la celularidad, señalan una disociación entre la activación de las células T y las alteraciones en la fisiología de las vías aéreas que caracterizan a la patología asmática<sup>[33]</sup>.

Además, aunque el número de pacientes que expresan IL-13 es mayor en BE que en asma (45,45% *vs* 30,77%), el nivel de expresión en los pacientes asmáticos es ligeramente superior a la de los pacientes con BE, dato confirmado en un artículo de Berry y colaboradores<sup>[204]</sup>, los cuales encontraron concentraciones superiores de IL-13 en el esputo de pacientes con asma moderada con respecto a individuos sanos y sujetos con BE, lo que apoya la teoría del papel crítico que dicha citocina juega en la fisiopatología del asma. Estas diferencias entre sujetos asmáticos y con BE en relación a los niveles de expresión de IL-13 han sido ratificadas recientemente por Siddiqui y colaboradores<sup>[205]</sup> al evaluar las posibles diferencias existentes entre ambas poblaciones de pacientes en relación a la IL-13. Observaron que sólo la estimulación con el suero de pacientes asmáticos, conducía a un incremento de la producción de IL-13 por parte de PBMC de sujetos sanos. A su vez, sólo en los linfocitos T y no en los eosinófilos del grupo de asma, esta interleucina se encontraba significativamente elevada, a nivel intracelular, al compararla con los niveles observados en individuos sanos y con BE. Así, en este trabajo vinculan la IL-13 con la HRB característica del asma. De igual forma, tal vez los mayores niveles de expresión de IL-13 que se han detectado en el análisis génico del EI de los pacientes con asma de nuestro estudio, podría estar influenciado por algún factor presente de forma diferencial en el foco inflamatorio pulmonar de los individuos asmáticos.

Si bien a nivel génico se detectó expresión de IL-5 en los dos grupos de individuos con patología, no se detectaron niveles de dicha citocina a nivel proteico en ninguno de los tres

grupos de estudio, aunque esto no parece ser un hecho anómalo, pues existen publicaciones corroborando el hecho de que la IL-5 suele encontrarse en niveles por debajo de los límites de sensibilidad de los kits de ELISA<sup>[180]</sup>.

Al evaluar la expresión de la IL-4, otra citocina Th2, se observó que sólo es expresada por las células del esputo de los pacientes asmáticos, no detectándose en las muestras de los pacientes con BE (Figura 21, apartado 4.4). Este hecho está en consonancia con los valores de IgE sérica detectados en los pacientes del estudio, dado el importante papel que la interacción de IL-4 y esta inmunoglobulina juega en la patología asmática<sup>[206]</sup>, ya que dicha citocina induce el cambio de isotipo IgE, de forma que a mayores niveles de IL-4, niveles más elevados de IgE.

Elevados valores de IL-4 en pacientes asmáticos en comparación con los encontrados en la BE, ya habían sido observados por Brightling y colaboradores<sup>[203]</sup> en grupos similares a los de nuestro estudio. Posiblemente, los niveles de expresión de esta citocina detectados en asma y BE esté vinculada al número de mastocitos (importante productor de esta citocina) presentes en la musculatura lisa de los pacientes, ya que los pacientes asmáticos presentan un mayor número de mastocitos infiltrando la musculatura lisa de las vías aéreas<sup>[34]</sup>.

Además de las citocinas de tipo Th2 también se evaluaron otras citocinas, tanto de tipo Th1, como el IFN- $\gamma$ , como inmunomoduladoras, la IL-10 y el TGF- $\beta$ 1.

A nivel génico, se observó una disminución del IFN- $\gamma$  tanto en BE como en asma al compararlo con el grupo de individuos sanos (apartado 4.4, Figura 22.A); sin embargo, en el sobrenadante del esputo se detectaron elevados niveles de esta citocina en los dos grupos de patología con respecto al grupo control (apartado 4.5, Figura 24.B). Esta discordancia entre ambos tipos de aproximación (génica y proteica) puede ser debida al momento en el que se recogió la muestra (24 horas después de la inducción), ya que los ácidos nucleicos suelen ser más lábiles y su período de estabilidad más corto. Sin embargo, el producto de ese aumento génico permanece más tiempo siendo viable y funcional.

El IFN- $\gamma$  es una de las citocinas características de la respuesta Th1. Sin embargo, existen trabajos en los que se han detectado elevados niveles de dicha citocina en individuos asmáticos<sup>[207]</sup> en los que estaría favoreciendo el proceso inflamatorio; incluso, se ha demostrado su acción conjunta con la IL-4 en varios sistemas<sup>[208]</sup>. Sin embargo, es considerado un importante regulador del mecanismo homeostático y su expresión haría preponderar una respuesta de tipo Th1 lo que, en ocasiones, tendría como resultado el restablecimiento del equilibrio en patologías de clara respuesta Th2 como, por ejemplo, la patología asmática. Además, su administración exógena

previene la eosinofilia y la hiperreactividad en las vías aéreas en conjunción con la síntesis de IL-10<sup>[202]</sup>.

El hecho de que los valores del IFN- $\gamma$  en el sobrenadante del esputo de los individuos enfermos estén significativamente por encima de los valores de los sujetos control, especialmente en el grupo de BE, sugiere un intento de reversión del desequilibrio hacia Th2 característico de estas patologías, aunque en el caso del asma, esos elevados niveles de IFN- $\gamma$  podrían estar ejerciendo un efecto perjudicial en conjunción con la IL-4, citocina que sólo ha sido detectada en este grupo.

Otros factores relevantes en los procesos patológicos de las vías respiratorias objeto de nuestro estudio, son las citocinas o factores con función reguladora como son la IL-10 y el TGF- $\beta$ 1.

Mientras que a nivel génico la IL-10 presenta una expresión similar en los tres grupos de estudio (Figura 22.A, apartado 4.4), en el sobrenadante del esputo se encuentra disminuida en el grupo de asma, mientras que los pacientes con BE poseen niveles similares a los encontrados en los sujetos control (Figura 24.A, apartado 4.5). Estos elevados niveles de IL-10 en los pacientes con BE respecto a los asmáticos son indicativos de un intenso mecanismo regulador, tal vez en un intento por atenuar la inflamación existente de tipo Th2.

La IL-10, definida inicialmente como el factor inhibidor de la síntesis de citocinas (CSIF), es producida por las células T (Th0, Th1 y Th2), macrófagos y células B. Es generada de forma relativamente tardía tras la activación de las células T, teniendo efectos supresores sobre la producción de citocinas y quimiocinas de monocitos e inhibiendo también la proliferación de las células T<sup>[209]</sup>. Esta aparición tardía podría constituir un intento por resolver el proceso inflamatorio. Todo esto sugiere que la IL-10 podría actuar como un factor inmunomodulador endógeno durante las respuestas inmunes vinculadas, por lo menos en parte, a los linfocitos T. Además, esta citocina tiene capacidad para inducir tolerancia a alérgenos por las células T<sup>[210]</sup> e inhibe la síntesis de IgE<sup>[211]</sup>; así, el incremento de IL-10 en el grupo de BE respecto al de asma explicaría también los valores de IgE sérica, cercanos al rango de normalidad, observados en los pacientes con BE (Figura 20, apartado 4.3), así como el marcado descenso que se detecta en el porcentaje de linfocitos (Tabla X).

Otra de las funciones atribuible a la IL-10 es su capacidad para abolir la producción de IL-4 e IL-5, concordando esto con la total ausencia de expresión de IL-4 en la BE.

Por otro lado, la existencia de valores elevados de IL-10 a nivel proteico en BE respecto al grupo de asma puede deberse a la alta concentración de PGE<sub>2</sub> observada en el sobrenadante del esputo de estos pacientes (Figura 25.B, apartado 4.6), ya que se ha demostrado que dicha prostaglandina es capaz de aumentar la señalización y función de la IL-10<sup>[212]</sup>. Cheon y colaboradores estudiaron las interacciones entre la PGE<sub>2</sub> y la IL-10 a través de la ruta Jak-STAT en células THP-1 (línea celular humana de leucemia monocítica aguda), observando que la PGE<sub>2</sub> incrementa la fosforilación de STAT-3, inducida por IL-10, a través de un mecanismo dependiente de AMPc, siendo esta modulación específica de determinadas poblaciones celulares. Así, estos procesos de regulación sugieren la posibilidad de una cooperación entre la PGE<sub>2</sub> y la IL-10 para promover las respuestas antiinflamatorias en diversas enfermedades con un importante componente inflamatorio y una elevada expresión de PGE<sub>2</sub> como es el caso de la BE.

El TGF- $\beta$ 1, factor de carácter pleiotrópico, se evaluó a nivel génico en el sedimento del esputo. Mientras que los pacientes con BE presentan valores similares a los encontrados en el grupo control, los pacientes con asma poseen niveles ligeramente inferiores respecto a ambos (Figura 22.B).

La familia de los TGF- $\beta$ s desarrolla importantes funciones biológicas interviniendo en procesos como la proliferación, diferenciación y apoptosis de diversos tipos celulares. En concreto, el TGF- $\beta$ 1 es capaz de inhibir a células T, células B, células dendríticas, eosinófilos y mastocitos. Además, puede modificar la función estructural de las células bronquiales epiteliales, los fibroblastos y las células musculares bronquiales, todas ellas células productoras de TGF- $\beta$ 1 tras su activación<sup>[213]</sup>. En este sentido, este factor actúa a través de un mecanismo de “feedback” o retroalimentación negativa al suprimir el estado de activación de las células que lo han originado.

Por otro lado, el TGF- $\beta$ 1 juega un importante papel en los procesos de inflamación e hiperreactividad de las vías aéreas<sup>[214]</sup>, de tal forma que una expresión elevada de dicho factor conduce, a través de la modulación de las células T reguladoras, a una disminución de la hiperreactividad generada por la acción de las células Th2.

Pero al igual que otros factores o mediadores del sistema inmune liberados en respuesta a un estímulo o daño, una activación persistente del TGF- $\beta$ 1 inducido por la cronicidad de un estado inflamatorio puede ejercer efectos perjudiciales, produciendo fibrosis tisular o remodelación, la cual genera o contribuye a la obstrucción variable al flujo aéreo en las vías respiratorias.

En este sentido, a nivel génico, los niveles de TGF- $\beta$ 1 están disminuidos en el grupo de asma respecto al grupo control (Figura 22.B, apartado 4.4), siendo más similares a éste los niveles

de expresión del grupo de BE (niveles intermedios al compararlos con asma y control), aunque las diferencias no son significativas.

En los pacientes con BE, los cuales no presentan hiperreactividad de las vías aéreas, los niveles observados de TGF- $\beta$ 1 son superiores a los observados en el grupo de asma, lo que podría ser indicativo de un proceso compensatorio para intentar inhibir la activación de muchos tipos celulares implicados en procesos inflamatorios. Además, la coexistencia de TGF- $\beta$ 1 e IL-10 en BE (esta última citocina en mayores niveles en BE que en asma) podría justificar la ausencia de HRB, ya que se ha demostrado que la expresión conjunta de ambos factores es necesaria o permite la supresión de dicho proceso. En este caso, el nivel incrementado de IL-10 es lo que proporciona ese carácter protector, ya que la expresión aislada de TGF- $\beta$ 1 se ha comprobado que no confiere esa protección adquirida por la coexistencia de ambos factores<sup>[215]</sup>. Asimismo, el microambiente particular de cada patología ha de tenerse en cuenta, ya que se ha demostrado que el contexto, y no el grado de TGF- $\beta$ 1, es lo esencial para sus efectos sobre la hiperreactividad de las vías aéreas<sup>[215]</sup>.

No menos importante es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Dicho factor se planteó como la base de una de las hipótesis plausibles para explicar la presencia de hiperreactividad bronquial en el asma y no en la BE<sup>[38]</sup>, aunque dicha hipótesis fue puesta en duda por estudios posteriores<sup>[39]</sup>.

Al evaluar dicho factor, observamos que a nivel génico los tres grupos presentan valores de expresión muy similares. Sin embargo, a nivel proteico, los pacientes con BE poseen niveles superiores de VEGF a los observados en los sujetos control, mientras que los de los pacientes asmáticos son sutilmente inferiores. Clásicamente se ha considerado que niveles incrementados de VEGF son una característica de la patología asmática asociada, a su vez, con un proceso de remodelación de la pared bronquial<sup>[216]</sup>; sin embargo, otros trabajos documentan niveles de VEGF en lavado broncoalveolar de individuos asmáticos, muy similares a los encontrados en sujetos sanos<sup>[39]</sup>, no existiendo datos claros sobre este parámetro en otras patologías respiratorias.

Por otro lado, existen otras teorías en las que el VEGF está asociado con estadios menos severos; así, en una fase de mayor cronicidad, el efecto ejercido por el VEGF sería suplido por otros mecanismos promotores de la inflamación.

Una solución a la controversia sobre el papel que este factor podría ejercer en diversas patologías respiratorias ha sido proporcionada por Siddiqui y colaboradores<sup>[217]</sup> en un estudio centrado en la remodelación vascular. Así, encontraron valores similares de VEGF en esputo entre los pacientes con BE y los sujetos con asma moderada, asma persistente severa y asma

refractaria. Esta similitud entre todos los grupos la explican mediante la disociación entre los niveles de VEGF y la HRB.

Por último, comentar los elevados niveles de IL-8 y TNF- $\alpha$  observados en asma y BE respecto al grupo control, existiendo significación estadística en el caso de la IL-8. Ésta es una citocina con importantes propiedades quimioatrayentes y pro-inflamatorias. A su vez, el TNF- $\alpha$  favorece la adhesión de leucocitos a la pared vascular. Así, ambos factores promoverían la migración de estas células inflamatorias desde el torrente circulatorio al foco de la inflamación<sup>[218,219]</sup>.

El patrón de citocinas a nivel proteico muestra una mayor respuesta Th1 e inmunorreguladora en los pacientes con BE, lo que podría explicar el hecho de que esta patología curse con una menor severidad que la patología asmática. Así, en el grupo de BE, el “compartimento” donde se produce el proceso inflamatorio (pulmón) parece mostrar una mayor capacidad de respuesta y actuación reparadora frente al daño generado por dicha inflamación. Los niveles superiores de citocinas Th2 y la menor presencia de citocinas Th1 y reguladoras en los pacientes asmáticos de nuestro estudio explican así, en parte, el mayor *estatus* inflamatorio residual existente en los pacientes de esta patología.

De esta forma, aunque ambas enfermedades presentan un patrón mayoritariamente de tipo Th2 en el perfil de citocinas, parece existir una mejor y mayor respuesta en los individuos con BE para intentar revertir el desequilibrio Th1/Th2.

## 5.6. MEDIADORES LIPÍDICOS: SU PAPEL EN EL ASMA Y LA BRONQUITIS EOSINOFÍLICA

Los mediadores lipídicos juegan un papel muy importante, tanto en la patología asmática como en la bronquitis eosinofílica.

Los leucotrienos, concretamente los cisteinil-leucotrienos (Cys-LTs), desarrollan un papel integral en la fisiopatología del asma ya que son importantes reclutadores de las células inflamatorias, broncoconstrictores (actúan de forma directa o también indirectamente aumentando la reactividad de las vías aéreas a otras sustancias), secretagogos, incrementan la permeabilidad vascular generando edema e intervienen de forma crucial en el proceso de remodelación de las vías respiratorias<sup>[4,59]</sup>.

Las prostaglandinas también están vinculadas a los procesos inflamatorios característicos de las patologías de las vías respiratorias, pudiendo ejercer tanto efectos antiinflamatorios como pro-inflamatorios. La  $PGD_2$ , producida mayoritariamente por mastocitos, está claramente asociada con el componente inflamatorio. Sin embargo, la  $PGE_2$  puede ejercer tanto efectos broncoprotectores<sup>[99]</sup> como broncoconstrictores<sup>[96,220]</sup>, en función de sus células diana, de los receptores a través de los cuales actúe y del microambiente existente en su entorno.

Dada la importancia de dichos mediadores lipídicos, se evaluó la concentración de  $LTC_4$  y de  $PGE_2$  en el sobrenadante del esputo (Figura 25, apartado 4.6), lo que proporcionó información acerca de los niveles de ambos mediadores en el foco inflamatorio de los pacientes de estudio y, por tanto, su posible contribución al proceso inflamatorio existente.

Se detectaron elevados niveles de  $PGE_2$  en el sobrenadante del EI de los pacientes con BE, estando muy por encima de los valores encontrados tanto en los sujetos del grupo de asma como en el grupo control. Además, la concentración del  $LTC_4$  presentaba una relación inversa a la de la prostaglandina estudiada, es decir, los pacientes asmáticos son los que poseían mayores niveles de este leucotrieno. De esta forma, el balance  $LTC_4/PGE_2$  se encontraba aumentado en la patología asmática debido, tanto a la disminución de la  $PGE_2$  respecto a los niveles observados de dicha prostaglandina en el grupo de BE, como a los elevados niveles de  $LTC_4$  que presentaba (Figura 26, apartado 4.6).

El incremento del  $LTC_4$  observado en los individuos asmáticos está en consonancia con el papel pro-inflamatorio de este Cys-LT descrito ampliamente en la literatura. La importancia adquirida por los Cys-LTs y, en concreto, por el  $LTC_4$ , se debe al hecho de que interviene promoviendo todos los aspectos que conforman la patología asmática.

Con respecto al infiltrado celular, el  $LTC_4$  junto al  $LTD_4$ , ejerce un importante papel como quimioatrayente de neutrófilos y eosinófilos, además de influir en la producción, supervivencia y funciones efectoras de este último subtipo celular, que posee un importante papel en el asma<sup>[221]</sup>. En concreto, Vieira-de-Abreu y colaboradores<sup>[222]</sup> observaron que en determinados procesos alérgicos, la neoformación de cuerpos lipídicos citoplasmáticos en los eosinófilos del infiltrado inflamatorio estaba dirigida a la síntesis concreta de  $LTC_4$ .

Por otro lado, se ha comprobado que los LTs se encuentran presentes de forma continua en las vías aéreas de los sujetos asmáticos, ejerciendo un importante papel en el mantenimiento de la broncoconstricción basal observada en estos individuos<sup>[69]</sup>.

Además, existe un mecanismo de retroalimentación positiva entre los Cys-LTs y las citocinas pro-inflamatorias existentes en el microambiente de la zona dañada. De esta forma,

tanto los mastocitos como las células dendríticas son estimuladas por dichos leucotrienos y generan una serie de citocinas que, a su vez, van a poder modificar el perfil de expresión de los receptores de Cys-LTs y de otros factores derivados del entorno que se observan en un estado inflamatorio<sup>[64,68]</sup>.

Asimismo, los Cys-LTs ejercen importantes efectos en el proceso de remodelación bronquial. Son capaces de reducir, de forma aguda, el diámetro del lumen de las vías aéreas así como de estimular crónicamente la hiperplasia muscular, manteniendo un elevado tono basal de la musculatura lisa. En este sentido, existe una sinergia con diversos factores de crecimiento para la promoción de la proliferación de los fibroblastos, favoreciendo el proceso de daño y fibrosis<sup>[223]</sup>.

A su vez, al incrementar la producción de moco por parte de las glándulas submucosas y las células productoras de dicha sustancia o células “goblet”, favorecen la obstrucción al flujo aéreo. Su capacidad para disminuir la actividad de los cilios respiratorios revierte en una disminución o fallo del proceso de aclaramiento, proceso de vital importancia para la eliminación de células inflamatorias.

De esta forma, los Cys-LTs participan a través de diversos mecanismos en la generación y mantenimiento del estado inflamatorio y broncoconstrictor presente en los sujetos asmáticos, siendo destacable su contribución al proceso de modificación estructural de las vías aéreas o proceso de remodelación.

El hallazgo más importante en relación a los análisis realizados en el sobrenadante del esputo fue los elevados niveles de  $PGE_2$  detectados en los sobrenadantes del esputo de los pacientes con BE al compararlos, tanto con los niveles de los individuos asmáticos, como con los niveles de los individuos control. Su importancia se debe a que, además de ser la primera vez que se determinan dichos niveles en estos pacientes, establece una clara diferencia en el microambiente del órgano diana entre los pacientes con asma y los individuos con BE.

La  $PGE_2$ , debido a su carácter pleiotrópico, ha generado un debate en torno a su capacidad protectora o perjudicial en las patologías respiratorias, concretamente asma y bronquitis eosinofílica. Valores incrementados de dicha prostaglandina en el sobrenadante del esputo de diversas patologías vinculadas a tos crónica, se relacionaron con un posible papel de la  $PGE_2$  en el aumento de la sensibilidad de estos pacientes a la capsaicina<sup>[224,225]</sup>.

En otros estudios se ha observado una correlación positiva entre los niveles de  $PGE_2$  y el grado de supervivencia eosinofílica en pacientes asmáticos por lo que, en este caso, la  $PGE_2$



contribuiría a la actividad inflamatoria de estas células<sup>[166]</sup>; además, su capacidad para generar la contracción de la musculatura lisa la capacita como potente broncoconstrictor<sup>[226]</sup>.

Sin embargo, los trabajos en los que se destaca el papel protector de la PGE<sub>2</sub> en diversos aspectos de las patologías respiratorias son numerosos, corroborando el papel de la PGE<sub>2</sub> inhalada como elemento atenuador de la broncoconstricción en diversas situaciones.

Gauvreau y colaboradores<sup>[99]</sup> observaron que la administración inhalada de 100 µg de PGE<sub>2</sub> reducía la respuesta asmática temprana y tardía inducida por alérgeno en 8 individuos con asma atópica moderada, los cuales presentaban una atenuación en la caída del FEV<sub>1</sub> así como una disminución de células metacromáticas (mastocitos y basófilos) en el esputo.

En 1994, Melillo y colaboradores<sup>[227]</sup> objetivaron una mejora en individuos asmáticos con broncoconstricción inducida por ejercicio. La administración mediante inhalación de PGE<sub>2</sub> 30 minutos antes de realizar un ejercicio o una provocación con metacolina, atenuaba significativamente en estos individuos, tanto el grado como el tiempo de duración de la broncoconstricción.

También han sido demostrados los efectos beneficiosos de la PGE<sub>2</sub> en el caso de asma inducida por aspirina<sup>[228,229]</sup>, consiguiéndose en estos pacientes una recuperación del FEV<sub>1</sub>.

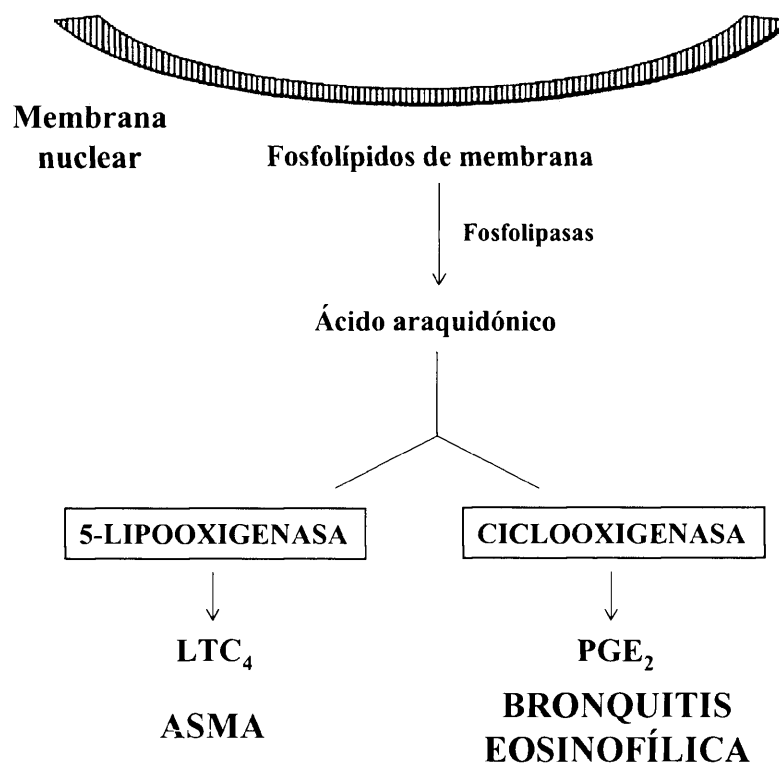
Incluso se ha demostrado el papel beneficioso de la PGE<sub>2</sub> en modelos animales. Así, Hartney y colaboradores<sup>[230]</sup> establecieron diversos modelos murinos modificados genéticamente en los que no se expresaba la enzima de degradación de la PGE<sub>2</sub>, disminuyendo en estos animales la respuesta a metacolina.

Así, la PGE<sub>2</sub> atenúa la broncoconstricción independientemente de la causa que la origine (alérgeno, ejercicio, ingesta de aspirina...).

Además, esta prostaglandina es capaz de actuar sobre la respuesta inmune humoral, disminuyendo o aumentando los niveles de IgE<sup>[88]</sup>, demostrando esto la diversa funcionalidad que puede tener la PGE<sub>2</sub> dependiendo de las características del entorno en el que se encuentre, pudiendo ser los elevados niveles de PGE<sub>2</sub> una de las causas que hayan originado los valores más bajos de IgE en los pacientes con BE de este estudio.

Dado que la PGE<sub>2</sub> es el eicosanoide predominantemente producido por el epitelio de las vías respiratorias, es lógico que ejerza diversas funciones en este entorno. Así, la PGE<sub>2</sub> es considerada un potente factor inhibidor de la mitogénesis, síntesis de colágeno y quimiotaxis de células mesenquimales, pudiendo disminuir la inflamación y la activación de los fibroblastos<sup>[70]</sup>, de manera que ejercería importantes funciones broncodilatadoras, antiinflamatorias y anti-fibróticas.

Esta capacidad del epitelio para producir  $\text{PGE}_2$  está inversamente relacionada con su habilidad para sintetizar Cys-LTs. Esto es lógico ya que ambos mediadores lipídicos se originan, a través de la actuación de distintas enzimas, a partir del mismo metabolito, el ácido araquidónico.



**Figura 41. Esquema de las rutas del ácido araquidónico primadas en el asma y la bronquitis eosinofílica.** Mientras que es la ruta de la 5-lipooxigenasa la que mayoritariamente está activada en la patología asmática, en la bronquitis eosinofílica habría una regulación positiva de la ruta de las ciclooxigenasas.

Partiendo de esta premisa, y a la luz de los resultados obtenidos, podemos concluir que en el microambiente pulmonar de los pacientes asmáticos está primada la vía de la 5-lipooxigenasa, con el consiguiente incremento de la síntesis de leucotrienos; sin embargo, es la vía de la ciclooxigenasa la que principalmente está activada en el foco inflamatorio de los pacientes con bronquitis eosinofílica. Esta producción diferencial de mediadores lipídicos posiblemente se deba al microambiente pulmonar predominante en cada patología concreta, respondiendo los distintos componentes celulares de ese área, de una forma u otra, en función de los estímulos a los que sean sometidos (Figura 41).

Este hallazgo podría explicar, en parte, las diferencias en relación al fenotipo clínico existentes entre asma y BE, de manera que los elevados niveles de  $\text{LTC}_4$  detectados en el grupo de asma podrían estar contribuyendo a la existencia de HRB, mientras que los altos niveles de

PGE<sub>2</sub> en el sobrenadante de los pacientes con BE, podrían estar contribuyendo a la ausencia de HRB en estos individuos.

## **5.7. NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS COMPONENTES ENZIMÁTICOS DE LA RUTA DE LA PGE<sub>2</sub> EN EOSINÓFILOS DE SANGRE PERIFÉRICA, ESPUTO INDUCIDO Y BIOPSIAS BRONQUIALES**

El conocimiento de las rutas biosintéticas de la PGE<sub>2</sub> ha aumentado de manera exponencial en los últimos 30 años con la clonación y caracterización de las enzimas específicas responsables de la síntesis de determinadas prostaglandinas.

La regulación de diversos pasos de esas rutas enzimáticas se ha convertido en una importante diana terapéutica en las patologías respiratorias. Inhibidores de las ciclooxigenasas en general, como los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES), o inhibidores específicos de la COX-2 (celecoxib), constituyen una importante vía en el intento por minimizar la sintomatología y patogenia de estas enfermedades.

Tras la liberación del ácido araquidónico de los fosfolípidos de membrana por la actuación de las fosfolipasas (secretada o citosólica), mediante las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) se produce el primer paso en la ruta biosintética generándose prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) que, dada su inestabilidad, es rápidamente transformada en otras prostaglandinas mediante la actividad de prostaglandinas sintasas (PGS) específicas. La PGE<sub>2</sub> puede ser producida por tres enzimas distintas:

- \* mPGES-1: prostaglandina sintasa E microsomal 1 (ó asociada a membrana).
- \* mPGES-2: prostaglandina sintasa E microsomal 2.
- \* cPGES: prostaglandina sintasa E citosólica.

Mientras que la mPGES-2 y la cPGES se expresan de forma constitutiva y ubicua en condiciones basales en numerosos tejidos de mamíferos, los niveles de mPGES-1 se incrementan por estímulos pro-inflamatorios<sup>[75]</sup>.

Al evaluar los mediadores lipídicos, se observó que el balance LTC<sub>4</sub>/PGE<sub>2</sub> se encontraba disminuido en el grupo de pacientes con BE con respecto a los pacientes asmáticos, debido a los elevados niveles de PGE<sub>2</sub>. Por ello, se decidió establecer este índice como parámetro de

referencia, ya que se considera que el balance de eicosanoides pro/antiinflamatorios en las vías respiratorias es más determinante que los niveles absolutos de los mediadores evaluados de forma independiente<sup>[231]</sup>. Como consecuencia de los elevados valores observados de la  $\text{PGE}_2$ , se decidió analizar la ruta enzimática de dicha prostaglandina, tanto en los eosinófilos de sangre periférica (célula relevante tanto en el asma como en la BE a nivel sistémico), como en la muestra cuyo origen es el foco inflamatorio (esputo inducido) así como en las biopsias bronquiales constituidas por algunos de los principales tipos celulares productores de  $\text{PGE}_2$ .

Ni a nivel sistémico (con el estudio de los eosinófilos de sangre periférica) ni en el caso del sedimento del esputo inducido, se encontraron diferencias importantes en la ruta enzimática de la  $\text{PGE}_2$ .

En el primer nivel de dicha ruta, principalmente en EI, se observó un aumento de la fosfolipasa secretada en los grupos de patología respecto a los individuos sanos.

Una diferencia importante entre la  $\text{cPLA}_2$  y la  $\text{sPLA}_2$  es la concentración de calcio intracelular que necesitan para ser activadas. Mientras que la fosfolipasa citosólica requiere concentraciones micromolares, la secretada necesita una concentración mayor, en el rango milimolar<sup>[232]</sup>. El aumento de expresión en EI de esta última fosfolipasa podría deberse a este factor, pudiendo también ser determinante para la expresión de la fosfolipasa citosólica detectada en los eosinófilos a nivel sistémico (sangre periférica).

El hecho de que sólo se detecte expresión de la  $\text{cPLA}_2$  en los eosinófilos del grupo de BE podría deberse a este factor. Por otro lado, la expresión de  $\text{cPLA}_2$  en ambos grupos no tiene por qué estar vinculada únicamente con la producción de eicosanoides, ya que como Myou y colaboradores<sup>[233]</sup> demostraron en el año 2001, tanto los macrófagos como los eosinófilos requieren la presencia de fosfolipasa citosólica para ejercer sus funciones efectoras en el pulmón. Por otro lado, el mayor nivel de expresión de la  $\text{sPLA}_2$  en los individuos asmáticos respecto a los pacientes con BE en las muestras de EI estaría respaldado por un trabajo de Hallstrand y colaboradores<sup>[163]</sup> en el que establecen una asociación entre  $\text{sPLA}_2$  y la síntesis de Cys-LTs, siendo el grupo de asma el que presenta una mayor concentración de  $\text{LTC}_4$  en el sobrenadante del esputo. Aunque en este estudio también establecían una relación entre  $\text{cPLA}_2$  y  $\text{PGE}_2$ , según Vichai y colaboradores<sup>[234]</sup> la única prostaglandina capaz de inducir la expresión de la fosfolipasa citosólica es la  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , lo que justificaría la ausencia de incremento de la  $\text{cPLA}_2$  en el grupo de BE a pesar de los elevados niveles de  $\text{PGE}_2$  encontrados en el sobrenadante del esputo de estos pacientes.

Con respecto a las ciclooxygenasas, posiblemente ni en los eosinófilos de sangre periférica ni en las muestras de EI, las diferencias encontradas impliquen un efecto biológico reseñable.

Un elemento regulador clave de la COX-2 es la IL-10. Dado que esta interleucina es un potente “desactivador” de macrófagos, podría regular la producción de mediadores lipídicos ya que los macrófagos son una importante fuente de producción de estos mediadores. Aunque la PGE<sub>2</sub> regula positivamente la síntesis de IL-10, esta citocina es capaz de regular la expresión de COX-2 (asociada a síntesis retardada<sup>[235]</sup>), tanto a nivel génico como proteico, por vías directas e indirectas<sup>[236]</sup>. De forma directa, la IL-10 es capaz de regular la expresión de COX-2 a nivel post-transcripcional disminuyendo el tiempo medio de vida del ARNm de dicha enzima<sup>[237]</sup>. Dado que el grupo de BE presenta niveles superiores de IL-10 (tanto de expresión génica como proteica), esto podría explicar, en parte, el hecho de que la COX-2 esté menos expresada en el grupo de BE que en el de asma. Sin embargo, de forma indirecta, la IL-10 podría ejercer el efecto contrario ya que, a través de la regulación de diversas citocinas inflamatorias, podría inducir la expresión de COX-2.

Un factor de gran importancia es la estabilidad del ARNm. Motivos ricos en secuencias AU (concretamente el pentámero “AUUUA”) están implicados, de forma general, en la degradación selectiva de mensajeros maduros expresados transitoriamente en el citoplasma<sup>[238]</sup>. La presencia de este tipo de secuencia en el 3'UTR de COX-2 sugiere un alto grado de renovación del ARNm que codifica para esta enzima<sup>[239]</sup>. Esta característica de la COX-2 hace que su vida media sea corta y, por lo tanto, sea más difícil su detección en los momentos de expresión o activación.

Todo ello (tipo celular, factores reguladores, control génico...) podría explicar la inexistencia de diferencias entre los grupos.

A su vez, en relación a las enzimas de síntesis y degradación, no existen diferencias en las muestras de EI aunque, en el caso de los eosinófilos circulantes, sí se detectó una disminución en los individuos de ambas patologías en la enzima de síntesis al comparar dicha expresión con la observada en los individuos sanos. Esto probablemente se deba al hecho de que este tipo celular, dado su carácter pro-inflamatorio, presente una mayor actividad de la ruta de la lipooxigenasa para la síntesis de leucotrienos.

Así, en el caso de los eosinófilos procedentes de sangre periférica, no existe una regulación positiva de las enzimas de la ruta enzimática de síntesis de la PGE<sub>2</sub>, tal vez debido a que es la ruta de la 5-lipooxigenasa (5-LO) la predominante en este tipo celular, ya que el LTC<sub>4</sub> es un importante leucotrieno producido por los eosinófilos. Además, dado que en este caso

concreto estos eosinófilos se localizan en sangre periférica, posiblemente no contribuyan al nivel de  $\text{PGE}_2$  detectado en el sobrenadante del EI cuyo origen es el pulmón.

Además, en vista de los resultados obtenidos en el análisis de la ruta enzimática de síntesis de la  $\text{PGE}_2$  en el sedimento celular del EI, las células que lo conforman no parece que contribuyan de forma mayoritaria a la producción final de esta prostaglandina observada en el sobrenadante del esputo inducido, en concreto, en BE. El esputo está constituido por diversos tipos celulares entre los que se encuentran los macrófagos. En el caso de los grupos con patología, el porcentaje de esta población celular se encontraba disminuido en relación a los sujetos sanos (Tabla X, apartado 4.2.2). Puesto que los macrófagos son una importante fuente de síntesis de  $\text{PGE}_2$ , su menor presencia podría explicar, en parte, la ausencia de regulación positiva de la ruta de síntesis de la  $\text{PGE}_2$  en la muestra de EI, por lo que la síntesis de dicha prostaglandina posiblemente tenga su origen en estirpes celulares diferentes de las que conforman el sedimento del esputo inducido.

Sin embargo, a diferencia de los resultados obtenidos en los dos tipos de muestra anteriores, el análisis génico de las biopsias bronquiales mostró una clara regulación positiva de la de la ruta enzimática de síntesis de la  $\text{PGE}_2$  en las muestras de los pacientes con BE (Figura 29, apartado 4.7.3). El hecho de que esté incrementada esta ruta en este tipo de muestra sigue un patrón lógico puesto que los principales tipos celulares productores de esta prostaglandina forman parte de las biopsias bronquiales: las células epiteliales, las células endoteliales y los fibroblastos.

En el primer nivel de la ruta, los niveles de expresión de ambas fosfolipasas, tanto en el caso de la BE como en el de asma, son superiores a los observados en los sujetos control, siendo mayor dicha expresión en BE (3,21 y 4,47 veces más) que en asma (2,29 y 2,37 veces más, respectivamente; Figura 29.A, apartado 4.7.3).

La  $\text{cPLA}_2$  muestra preferencia por el ácido araquidónico frente a otros ácidos grasos<sup>[240]</sup>, siendo activada por concentraciones submicromolares de  $\text{Ca}^{2+}$  y por un proceso de fosforilación. Así, parece tener como función primaria (aunque no exclusiva) la liberación de ácido araquidónico para la producción de eicosanoides, lo que la convierte en un componente integral en la generación de  $\text{PGE}_2$ <sup>[241]</sup>. Por ello, los elevados niveles de expresión génica de la  $\text{cPLA}_2$  encontrados en las biopsias bronquiales, explicarían que las estirpes celulares que constituyen este tipo de muestra fueran las principales responsables del incrementado nivel de  $\text{PGE}_2$  encontrado en el sobrenadante de los pacientes con BE.

Posiblemente, el hecho de que ambas fosfolipasas estén elevadas en el grupo de BE se deba a la interacción o retroalimentación que puede existir entre ambas enzimas, no estando vinculados sus niveles, de forma exclusiva, a la producción de eicosanoides en el pulmón sólo en estados fisiopatológicos, sino también en estados de normalidad. Esto fue demostrado por Samet y colaboradores<sup>[242]</sup> los cuales constataron la existencia basal de sPLA<sub>2</sub> en las vías aéreas de sujetos sanos. Así, esta fosfolipasa puede actuar por vías diferentes en la síntesis de eicosanoides: bien por acción enzimática directa sobre los fosfolípidos de membrana o a través de la señalización del receptor, lo que conlleva la activación de la fosfolipasa citosólica<sup>[243]</sup>. Además, esta enzima secretada también interviene en la regulación de la activación de la cPLA<sub>2</sub> mediante la estimulación de la ruta de las proteínas kinasas activadas por mitógeno (MAPKs), las cuales activan a la cPLA<sub>2</sub> a través de un proceso de fosforilación<sup>[244]</sup>. Otra de sus características es que es capaz de inducir una liberación importante de ácido araquidónico en casos de deficiencia de la cPLA<sub>2</sub>, siendo esto de gran importancia en algunos estados patológicos en los que no existe activación de dicha enzima.

Todo esto explicaría el paralelismo existente en la expresión de ambas enzimas en el grupo de BE.

En el caso de las ciclooxigenasas, la COX-1 presenta valores elevados de expresión en las dos patologías de estudio respecto al grupo de referencia, siendo mayor el incremento en el caso del grupo de bronquitis eosinofílica. Este aumento de la ciclooxigenasa constitutiva es llamativo, aunque se ha observado que puede existir el acoplamiento entre PGES y COX-1 (la mPGES-1 se acopla preferencialmente a COX-2) cuando el ácido araquidónico es proporcionado de forma abundante, normalmente por una activación “explosiva” de la cPLA<sub>2</sub><sup>[82]</sup>.

Sin embargo, el patrón de expresión en el caso de la ciclooxigenasa inducible es diferente: mientras que en el grupo de asma los niveles son similares a los observados en los sujetos sanos, los pacientes con BE presentan una expresión muy incrementada respecto al grupo control (8,67 veces más) así como al grupo de asma (10,05 veces más;  $p < 0,01$ ).

COX-2 es la isoforma mayoritariamente implicada en la producción endógena de PGE<sub>2</sub><sup>[98]</sup>. Aunque existe un número limitado de trabajos centrados en el estudio del efecto que tienen las prostaglandinas sobre la COX-2, dichos efectos parecen depender tanto del tipo celular como de la concentración a la que se encuentre el metabolito existiendo, en ocasiones, resultados contradictorios.

Así, Vichai y colaboradores<sup>[234]</sup> observaron que, a altas concentraciones, la PGE<sub>2</sub> es capaz de incrementar los niveles de expresión de la COX-2 en fibroblastos pulmonares de ratón, mientras que en ese mismo tipo celular una concentración pequeña de dicha prostaglandina ejerce

una regulación negativa. Sin embargo, Faour y colaboradores<sup>[245]</sup> observaron que, en gran parte, es el propio producto de la COX-2, la PGE<sub>2</sub>, la responsable de la activación de la cascada de MAPKs, las cuales estabilizan el ARNm e incrementan la síntesis de COX-2. Así, dicho grupo observó que la PGE<sub>2</sub> mitiga el descenso del ARNm de COX-2 así como la inhibición de la transcripción de la proteína, proceso principalmente mediado por la región 3'UTR de COX-2. Además, el proceso de estabilización se lleva a cabo mediante una retroalimentación positiva a través de la regulación de la p38 MAPK dependiente de PGE<sub>2</sub> mediante el receptor EP4. Así, en el caso de la ruta enzimática en las biopsias bronquiales, la PGE<sub>2</sub> podría ejercer una retroalimentación positiva de la ruta mediante la estabilización del ARNm y la potenciación de la transcripción de la COX-2.

Por otro lado, el ligero incremento de la PGES en el esputo de los pacientes asmáticos puede explicarse mediante el efecto inductor que los estímulos pro-inflamatorios ejercen sobre esta enzima. De esta forma, el ambiente de inflamación más activo existente en los pacientes asmáticos debido al proceso de remodelación, niveles de citocinas Th2, etc<sup>[234]</sup>, se convierte en un estímulo capaz de activar a esta enzima. Sin embargo, las vías de la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa son excluyentes ya que ambas enzimas tienen un sustrato común, el ácido araquidónico. En el caso de los pacientes asmáticos, el ácido araquidónico posiblemente se está metabolizando de forma mayoritaria por la ruta de la 5-lipooxigenasa para la producción de diversos Cys-LTs, como demuestran los resultados del ratio LTC<sub>4</sub>/PGE<sub>2</sub> (apartado 4.6). Así, el balance entre la enzima productora de PGE<sub>2</sub> y la de síntesis del LTC<sub>4</sub> parece inclinarse hacia el lado de la producción de los leucotrienos en el grupo de asma.

Por último, tanto en asma como en BE, la 15-PGDH se encuentra muy elevada, quizás para intentar equilibrar la síntesis de PGE<sub>2</sub> en el caso del grupo de BE. Además, dado que la 15-PGDH también regula la degradación de otras prostaglandinas, esos niveles no sólo estarían vinculados a la degradación de la PGE<sub>2</sub>. A su vez, la PGES se encuentra aumentada 3,33 y 1,76 veces en BE y asma respectivamente, respecto al grupo de sujetos sanos (Figura 29.C, apartado 4.7.3), confirmando que es el tándem COX-2/mPGES-1 el que principalmente actúa en la síntesis de la PGE<sub>2</sub> en los sujetos con BE.

De esta forma, la ruta de síntesis de la PGE<sub>2</sub> se encuentra regulada positivamente en las muestras de biopsias bronquiales de los pacientes con BE respecto al grupo de asma, siendo las células epiteliales, las células endoteliales y tal vez los fibroblastos, elementos a tener en cuenta



para la regulación de la inflamación ya que parecen ser los principales productores de la  $\text{PGE}_2$ , prostaglandina con un importante papel antiinflamatorio.

Dada la multitud de factores implicados en la síntesis de prostaglandinas y la señalización de la ruta (fosfolipasas, ciclooxigenasas, receptores y sintasas), es bastante probable que la regulación de dicha producción sea un proceso de gran complejidad y diversificación entre los diferentes tipos celulares. Puesto que la ruta enzimática del metabolito de estudio presenta múltiples estadios de regulación, una posibilidad es que no siempre los niveles del metabolito final, en este caso la  $\text{PGE}_2$ , sean el factor prioritario en la regulación de las enzimas de síntesis terminales, aunque pueda ejercer, en menor o mayor grado, cierta influencia.

Así, en el intento por comprender la regulación de esta ruta, han de tenerse en cuenta no sólo los factores que influyen en el metabolito final, sino también todos aquellos estímulos que afectan a los pasos intermedios, por lo que el estudio de los mecanismos de regulación de los distintos estadios de la ruta de síntesis sería uno de los futuros abordajes.

## **5.8. ESTUDIO DE LOS RECEPTORES DE LA $\text{PGE}_2$ : PATRÓN DE EXPRESIÓN EN EOSINÓFILOS CIRCULANTES, ESPUTO INDUCIDO Y BIOPSIAS BRONQUIALES**

Los receptores de la  $\text{PGE}_2$  juegan un papel primordial en la actividad de esta prostaglandina en múltiples patologías, siendo el tejido diana específico un componente fundamental en los diversos procesos que media dicho prostanoide.

Debido al importante papel que los receptores desempeñan en la funcionalidad de la  $\text{PGE}_2$ , se decidió evaluar sus niveles de expresión en las distintas muestras de estudio: eosinófilos de sangre periférica, sedimento de esputo inducido y muestras de biopsias bronquiales.

A nivel génico, se estudió la expresión de los cuatro receptores de la  $\text{PGE}_2$ . En eosinófilos de sangre periférica no se detectó expresión génica de EP1 y EP3 en ninguno de los tres grupos de estudio. Por el contrario, al evaluar los receptores EP2 y EP4, el grupo de BE presenta niveles muy superiores de EP2, tanto en relación al grupo control como al grupo de pacientes asmáticos (4,03 y 7,78 veces más respectivamente, Figura 30 apartado 4.8.1.1). Sin embargo, en el caso de EP4, mientras en el grupo de BE los niveles son similares a los

observados en el grupo control, los pacientes con asma presentan una disminución de dicho receptor, siendo este descenso de más de 10 veces con respecto a los otros dos grupos ( $p < 0,05$ ).

Mita y colaboradores<sup>[167]</sup>, en el año 2002, caracterizaron los subtipos de receptores presentes en la superficie de los eosinófilos de sangre periférica de humanos. En su estudio, dicha subpoblación celular expresa los receptores EP2 y EP4 pero no detectaron expresión de EP1 y EP3, por lo que estos datos están en consonancia con nuestros resultados (apartado 4.8.1).

A nivel proteico, y mediante el uso de la microscopía confocal se verificó que, tanto los eosinófilos circulantes de los pacientes asmáticos como los de los sujetos con BE del estudio, expresaban en su superficie los receptores EP2 y EP4 de la  $PGE_2$  (Figura 33, apartado 4.8.2.1). Esta evaluación cualitativa se confirmó con la cuantificación de la expresión de dichos receptores mediante citometría de flujo. Tanto para el receptor EP2 como para el EP4, se observó una mayor expresión en los eosinófilos de los individuos del grupo de BE que en los de asma (Figura 35, apartado 4.8.2.2). Dentro de BE, es el receptor EP2 el que presenta un porcentaje ligeramente mayor de expresión en comparación con el EP4 (83,04% *vs* 71,33%); sin embargo, en el caso del grupo de pacientes asmáticos, es mayor la expresión de EP4 que la de EP2 (55,66% *vs* 41,38%, respectivamente) en eosinófilos de sangre periférica.

Por tanto, en los eosinófilos de sangre periférica de los pacientes con BE existe una confirmación entre los datos obtenidos mediante citometría de flujo y los hallados a nivel génico a través de la PCR Cuantitativa a Tiempo Real, mostrando una regulación positiva de la expresión de los receptores EP2 y EP4 en estos pacientes. Esto repercutiría en una mayor actividad de la  $PGE_2$  en los individuos de esta patología, pudiendo amplificar sus efectos beneficiosos antiinflamatorios ya que, a la actuación de la  $PGE_2$  a través de estos receptores, se le atribuyen propiedades supresoras de la inflamación mediante la inhibición de citocinas y factores pro-inflamatorios como el  $TNF-\alpha$ , o incrementando los niveles de citocinas antiinflamatorias o reguladoras como la IL-10<sup>[246]</sup>. Shinomiya y colaboradores, en un estudio del año 2001 evaluaron, en modelos murinos “*knock-out*” para los receptores EP2 y EP4, los efectos de la  $PGE_2$  y diversos agonistas de los receptores mencionados sobre la producción de  $TNF-\alpha$  e IL-10 inducida por zimósán (carbohidrato insoluble procedente del *Saccharomyces cerevisiae* con capacidad para activar al complemento por la vía alternativa). Así, observaron que en los cultivos de macrófagos peritoneales con zimósán en los que se había detectado un incremento tanto de  $TNF-\alpha$  como de IL-10, el cultivo posterior con  $PGE_2$  y los agonistas de EP2 y EP4, producía una disminución del  $TNF-\alpha$  y un incremento de la IL-10, siendo en ambos casos dependientes de concentración.

Además, a tenor de los resultados obtenidos, postularon que el receptor EP2 podría estar ejerciendo efectos más pronunciados que los conseguidos al actuar la  $PGE_2$  sólo a través del EP4. Así, la  $PGE_2$  es capaz de regular la síntesis de citocinas inflamatorias y reguladoras a nivel del ARNm. Este mecanismo regulador lo ejercerían a través de un aumento del AMPc puesto que no observaron efecto alguno con agonistas de los receptores EP1 y EP3.

Por otro lado, Ying y colaboradores<sup>[168]</sup> caracterizaron la expresión de los receptores de la  $PGE_2$  en las diversas estirpes celulares presentes en el esputo. A diferencia de lo encontrado por Haruhisa Mita<sup>[167]</sup>, Ying observó que los eosinófilos presentes en el esputo sí expresaban los cuatro receptores, aunque esta expresión era muy baja en los eosinófilos de los sujetos sanos, siendo superior en la muestra de pacientes asmáticos. Además, tanto los neutrófilos como el resto de tipos celulares estudiados (linfocitos, células epiteliales y células escamosas) contribuían al porcentaje de expresión global de los cuatro receptores en los pacientes asmáticos. Como dato relevante, destacaron la importante expresión de EP4 en la superficie de los macrófagos de la muestra de estudio.

En el presente trabajo no se ha realizado una evaluación individualizada de los receptores EP2 y EP4 en cada uno de los tipos celulares que constituyen el sedimento celular del esputo. Sin embargo, el perfil general de expresión observado en este tipo de muestra es homólogo al encontrado en los eosinófilos de sangre periférica, presentando el grupo de pacientes con BE mayor expresión, tanto de EP2 como de EP4, en comparación con los niveles génicos observados en el sedimento celular del esputo de pacientes con patología asmática (2,02 y 1,36 veces más, respectivamente; Figura 31, apartado 4.8.1.2).

Aunque los pacientes con BE expresan mayores niveles del receptor EP4 que los individuos asmáticos, ambos grupos se encuentran por debajo de los individuos control en la muestra de esputo inducido. Basándonos en el trabajo de Ying y colaboradores<sup>[168]</sup> previamente mencionado, en el que destacaba la elevada expresión de EP4 en los macrófagos del esputo inducido, la disminución en la expresión de dicho receptor en nuestros grupos con patología, podría ser consecuencia del bajo porcentaje de macrófagos observado, respecto al grupo de individuos sano o grupo de referencia, al analizar la celularidad del EI mediante citometría de flujo en los pacientes de ambas patologías.

Sin embargo, al evaluar en este tipo de muestra los receptores EP1 y EP3, sí encontramos expresión del receptor EP3, aunque dicha expresión es prácticamente la misma en los tres grupos de estudio, por lo que los efectos ejercidos por la  $PGE_2$  a través de este receptor concreto no influirían en las características diferenciales existentes entre ambas patologías. Esto implica que la fuente de EP3 en la muestra de esputo no son los eosinófilos, ya que al haber un mayor

porcentaje de este tipo celular en los grupos con patología, esta expresión del receptor EP3 debería ser diferente a la encontrada en los individuos control.

Aunque en las muestras anteriormente mencionadas ya se observa claramente un incremento generalizado de los receptores pares de la  $PGE_2$  en el grupo de BE respecto a los pacientes asmáticos, es en las biopsias bronquiales donde este aumento se aprecia con mayor claridad.

En estas muestras, los receptores EP1 y EP3 se expresan de forma similar en los tres grupos de estudio, aunque los niveles de expresión son ligeramente superiores en el grupo de asma. Estos datos refuerzan la hipótesis que plantea que los efectos pro-inflamatorios de la  $PGE_2$  son ejercidos a través de EP1 y EP3, principalmente a través de este último<sup>[94,96]</sup>.

Sin embargo, es en los receptores EP2 y EP4 donde se observan claras diferencias. En estos receptores, el grupo de BE presenta una elevada expresión frente a los otros dos grupos de estudio. Así, en el caso de EP2, los pacientes con BE presentan niveles 3,18 y 1,85 veces más que los sujetos control y el grupo de asma. En relación al EP4, las diferencias son mayores (4,75 y 2,38 veces más, respectivamente) aunque, probablemente debido al pequeño tamaño muestral, no se alcanza la significación estadística (Figura 32, apartado 4.8.1.3).

El papel protector de los receptores pares ha sido puesto de manifiesto en un reciente estudio de un grupo investigador español. Herrerías y colaboradores<sup>[247]</sup>, en un modelo murino de asma por ácaros, confirmó el papel protector de la  $PGE_2$  posiblemente a través de dichos receptores, concretamente mediante EP2. Tras la administración de  $PGE_2$  y Sulprostón (agonista de EP3 y parcialmente de EP1) a ratones asmáticos observaron, pero sólo en el caso del tratamiento con  $PGE_2$ , una disminución de citocinas de tipo Th2, una reducción de la eosinofilia y una pérdida o restricción de la actividad de los mastocitos del parénquima pulmonar. Esta ausencia de funcionalidad del Sulprostón con respecto a estos parámetros, sugiere que es el receptor EP2 a través del cual la  $PGE_2$  ejerce estos efectos protectores y antiinflamatorios.

Todos estos datos sugieren que los elevados niveles de  $PGE_2$  detectados en el sobrenadante de los pacientes con BE en conjunción con los mayores niveles de expresión de los receptores EP2 y EP4 en las muestras evaluadas de estos pacientes (sobre todo los observados en las biopsias bronquiales), redundarían en una mayor actividad de la  $PGE_2$ , primando los efectos antiinflamatorios que esta prostaglandina puede llegar a mediar y que explicarían el menor grado de gravedad clínica atribuida a la BE en comparación con el asma.

## 5.9. EFECTOS EJERCIDOS POR LA PGE<sub>2</sub> SINTÉTICA Y EL SOBRENADANTE DEL ESPUTO INDUCIDO SOBRE LA APOPTOSIS EOSINOFÍLICA

La apoptosis juega un papel central en el desarrollo, homeostasis y función del sistema inmune. En contra del concepto deteriorado que de ella se tiene, cumple una importante función en los procesos que cursan con inflamación, ya que tiende a limitar el daño tisular inflamatorio y promueve la resolución más que la progresión de la inflamación. Así, un requerimiento previo indispensable para alcanzar la resolución del “problema inflamatorio” es conseguir que las células inflamatorias extravasadas, así como su contenido citotóxico, sean eliminadas eficientemente de los tejidos<sup>[130]</sup>.

En concreto, la apoptosis eosinofílica es un fenómeno de gran importancia en la resolución de la eosinofilia en las vías aéreas de los pacientes asmáticos, así como en la de la eosinofilia presente en el esputo, la cual se encuentra vinculada a la gravedad clínica de dicha patología<sup>[248]</sup>. De esta forma, fármacos como los corticosteroides y la teofilina promueven la apoptosis eosinofílica a través de diversos mecanismos: disminución del tiempo de la supervivencia (inducida por IL-5) de los eosinófilos, incremento de IL-12 que promueve la apoptosis eosinofílica, inducción directa de apoptosis, etc<sup>[45]</sup>.

Dada la gran trascendencia de la apoptosis como mecanismo regulador del proceso inflamatorio, se evaluaron los efectos que la PGE<sub>2</sub> pudiera ejercer sobre la apoptosis de los eosinófilos, siempre a través de los receptores EP2 y EP4, ya que son los que se ha observado que se expresan en este tipo celular.

Al incubar los eosinófilos purificados de sangre periférica, tanto con PGE<sub>2</sub> como con diversos agonistas de sus receptores (Butaprost, selectivo para EP2 y 11-deoxi-PGE<sub>1</sub>, específico para EP2 y EP4), no se observó ningún cambio en el porcentaje de eosinófilos apoptóticos tras 18 h en cultivo con respecto a los eosinófilos cultivados sin ningún tipo de estímulo (Figura 37, apartado 4.9.2), aunque sí se observaran efectos con el sobrenadante del esputo de pacientes con BE (Figura 36, apartado 4.9.1).

De forma clásica, la PGE<sub>2</sub> ha sido asociada con un papel proliferativo y pro-tumorigénico desempeñado mediante diversos mecanismos. Este papel como inductor de la proliferación está vinculado principalmente al receptor EP2, ya que es el que produce un mayor aumento de los niveles de AMPc, siendo este mensajero capaz de inhibir la apoptosis mediante un mecanismo dependiente de proteínas kinasa, principalmente en el caso de la apoptosis

neutrofílica<sup>[249]</sup>. Sin embargo, en los últimos 15 años, han surgido diversas publicaciones en las que los mismos mecanismos a través de los cuales se explicaba la inducción de la proliferación a través del incremento de AMPc, ahora se utilizan como argumento al defender el papel anti-tumorigénico o promotor de la apoptosis de dicho mensajero secundario y, por lo tanto, de la PGE<sub>2</sub>. En un reciente artículo de Sousa y colaboradores<sup>[250]</sup>, a través de un modelo murino de asma por ovoalbúmina (OVA), se demostró que el aumento del AMPc incrementaba la apoptosis eosinofílica. Estos elevados niveles de AMPc promueven la activación de un efector suyo, la proteína kinasa A (PKA) la cual inhibe la señalización de la vía del PI3K/Akt. La regulación negativa de la fosforilación de Akt conduce a la apoptosis o podría prevenir la activación de NF- $\kappa$ B, factor de transcripción de gran importancia en la supervivencia eosinofílica. De esta forma la PGE<sub>2</sub>, a través de los receptores EP2 y EP4 los cuales producen un incremento de los niveles de AMPc intracelular, podría promover o aumentar la apoptosis eosinofílica resolviendo, en parte, el proceso inflamatorio.

Una posible explicación para la ausencia de actuación de la PGE<sub>2</sub> sobre la apoptosis eosinofílica observada en los ensayos realizados en este estudio es que, aún produciéndose un incremento en los niveles de AMPc, ese aumento tal vez no sería suficiente para ejercer ningún efecto con respecto al número ni a la actividad proliferativa de las células<sup>[251]</sup>.

La actividad pro-apoptótica desarrollada por la PGE<sub>2</sub>, además de por el aumento de AMPc, puede ser mediada por la inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS)<sup>[251]</sup>, asociándose también tanto a la presencia de TNF- $\alpha$ <sup>[251]</sup> como a la inducción de óxido nítrico (NO), el cual regula positivamente la ruta Fas-Fas ligando<sup>[252]</sup>, aunque esta última vía depende de la concentración de PGE<sub>2</sub> existente. Así, otra posibilidad es que la PGE<sub>2</sub> no actúe a través del AMPc, sino que sean las otras dos rutas las que prevalezcan en la función de la PGE<sub>2</sub> en relación a la apoptosis eosinofílica. En este caso, el ambiente en el que se encuentran los eosinófilos en cultivo es muy restringido (en cuanto a la concentración de otros factores que pudieran intervenir en el proceso de apoptosis), no teniendo la influencia de ningún otro factor más que el estímulo utilizado en cada caso.

Sin embargo, cuando se evaluó la apoptosis de los eosinófilos cultivados con sobrenadantes de pacientes de BE y asma, se observó un importante incremento de este proceso en el caso de los eosinófilos cultivados con los sobrenadantes de pacientes con BE, siendo el porcentaje de muerte celular idéntico entre el grupo control (eosinófilos cultivados con sobrenadantes de sujetos sanos) y el grupo con sobrenadantes de pacientes con asma, ambos

inferiores al porcentaje de apoptosis observado en el caso de los sobrenadantes de los sujetos diagnosticados de BE (Figura 36, apartado 4.9.1).

Esa diferencia sustancial entre los cultivos con  $\text{PGE}_2$  y agonistas sintéticos de los receptores pares de dicha prostaglandina, y los ensayos *ex vivo*, posiblemente se deba al microambiente existente en ese sobrenadante, en el que además de  $\text{PGE}_2$  existen otros muchos mediadores que podrían actuar sinérgicamente con la prostaglandina, conduciendo a la apoptosis de los eosinófilos. Este microambiente es el que, de igual forma, en el caso de los pacientes asmáticos, modula la actividad de la  $\text{PGE}_2$ , estableciendo una correlación entre los niveles de  $\text{PGE}_2$  y la supervivencia eosinofílica<sup>[166]</sup>. Así, la apoptosis observada en estos ensayos puede deberse a la conjunción o actuación individualizada de diversos mecanismos, algunos de los cuales son:

1. En otros tipos celulares la  $\text{PGE}_2$ , asociada a un incremento de AMPc mediado por la activación del receptor EP2, induce su apoptosis<sup>[253]</sup>, pudiendo intervenir de la misma forma en el caso de los eosinófilos cultivados con los sobrenadantes de pacientes.

2. El sobrenadante del esputo no sólo está constituido por  $\text{PGE}_2$ , sino que dicho mediador lipídico se encuentra acompañado por múltiples factores y metabolitos. Así, ya en el año 2004, Jones y colaboradores<sup>[252]</sup> demostraron que la  $\text{PGE}_2$  es capaz de inducir apoptosis eosinofílica a través de la producción de óxido nítrico (NO) mediante la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), lo que conllevaría la regulación positiva de CD95/CD95L (receptor en superficie asociado a muerte celular). Así, en esos sobrenadantes, además de  $\text{PGE}_2$  pueden existir elevados niveles de NO que favorecerían el proceso apoptótico observado. Este efecto pro-apoptótico a través de la  $\text{PGE}_2$  y el NO se ha encontrado en otros tipos celulares, incluso en líneas celulares tumorales<sup>[254]</sup>. Aunque no se ha utilizado como parámetro de clasificación en este estudio, el eNO se encontraba incrementado en algunos de los pacientes con BE, no habiendo sido incluido este dato ya que esta técnica se instauró como prueba clínica rutinaria en el Departamento de Alergología de forma posterior a la recogida de las muestras de los pacientes de este estudio. Este valor elevado de NO contribuiría a la promoción del proceso apoptótico.

3. Por otro lado, en el sobrenadante de los pacientes con BE, se detectaron niveles incrementados de  $\text{TNF-}\alpha$  con respecto a los individuos asmáticos. Existen trabajos que afirman que la actuación conjunta de  $\text{TNF-}\alpha$  y AMPc promueve la muerte celular programada en timocitos<sup>[255]</sup>. En el sobrenadante de los pacientes con BE, y a través de la actuación de la  $\text{PGE}_2$  sobre los eosinófilos mediante los receptores EP2 y EP4, podrían existir niveles elevados de AMPc que, junto a los altos niveles de  $\text{TNF-}\alpha$  (Figura 23.B, apartado 4.5), estarían ejerciendo el

mismo efecto observado por Kizaki y colaboradores<sup>[255]</sup> en los timocitos, aunque en este caso sobre los eosinófilos purificados de sangre periférica.

4. No podemos olvidar el posible papel que determinadas citocinas reguladoras pueden llegar a ejercer con respecto a la apoptosis. En el apartado 4.5 se detallan los elevados niveles proteicos de IL-10 del sobrenadante de los pacientes con BE (Figura 24.A), siendo dichos niveles el doble de los observados en el mismo tipo de muestra de los pacientes con asma. La IL-10 puede desempeñar un papel importante en la inhibición de la supervivencia y proliferación de los eosinófilos<sup>[256]</sup>. Además, es conocido el proceso de retroalimentación positiva que puede establecerse entre la PGE<sub>2</sub> y la IL-10<sup>[98,212]</sup>. Así, la apoptosis observada en los ensayos de eosinófilos cultivados con sobrenadantes del grupo de pacientes con BE, también podría deberse a la actuación sinérgica de PGE<sub>2</sub> e IL-10.

5. Se ha descrito el aumento de la susceptibilidad a apoptosis por parte de los eosinófilos en presencia de citocinas Th1 como IFN- $\gamma$ <sup>[257]</sup>. Wen y colaboradores, en un estudio con una línea celular de células epiteliales (A549), observaron que el IFN- $\gamma$  induce el proceso de apoptosis a través de la activación de caspasas. De esta forma, el incremento en el porcentaje de apoptosis observado en los ensayos realizados con el sobrenadante de los pacientes del grupo de BE, en parte se podría deber a la elevada concentración de esta citocina Th1 observada en estos pacientes con BE (Figura 24.B, apartado 4.5).

Sin embargo, aunque la PGE<sub>2</sub> desarrolle una función anti-proliferativa mediante la inducción de apoptosis, ha de existir un mecanismo regulador que, en parte, contrarreste dicho efecto, pues en la muestra de esputo los pacientes con BE presentan un mayor porcentaje de eosinófilos que los individuos asmáticos. Posiblemente exista algún tipo de mecanismo regulador a nivel de las proteínas kinasas A y C (PKA y PKC), kinasas opuestas con respecto a determinados mecanismos desarrollados por la PGE<sub>2</sub> en relación a factores del proceso inflamatorio (inhibición o activación de citocinas, regulación de la apoptosis...). Como se ha demostrado en numerosas ocasiones, a veces es difícil extrapolar los resultados obtenidos *in vitro* a lo que realmente sucede *in vivo*. Sin embargo la PGE<sub>2</sub>, en consonancia con otros factores, es capaz de inducir apoptosis eosinofílica, siendo éste un mecanismo de gran importancia en el control de la inflamación existente tanto en el asma como en la bronquitis eosinofílica.



## 5.10. LA PGE<sub>2</sub> COMO ELEMENTO REGULADOR DE LA HIPERPLASIA MUSCULAR

El proceso de remodelación, junto a la HRB, es una de las principales características diferenciales entre BE y asma. Uno de los procesos que participa en el fenómeno de la remodelación es la hiperplasia de las células musculares lisas bronquiales (CMLB).

Las células musculares lisas de las vías aéreas son las principales células efectoras de la regulación del tono broncomotor en respuesta a diversos neurotransmisores, mediadores pro-inflamatorios y sustancias exógenas<sup>[258]</sup>. Este tipo celular, influido por diversos factores, participa en la regulación del proceso inflamatorio de la mucosa mediante un cambio de fenotipo o la secreción de citocinas, mediadores y enzimas pro-inflamatorias. La interacción entre la musculatura lisa de las vías aéreas (MLVA) y los diferentes factores del medio, genera cambios en la contractilidad de la musculatura, alteración característica de la patología asmática<sup>[259]</sup>, pudiendo producirse tanto hipertrofia como hiperplasia. Los diferentes estímulos provocan la modificación y crecimiento de la capa muscular lisa lo que repercute en un estrechamiento de las vías respiratorias generando, a su vez, la característica obstrucción variable al flujo aéreo presente en los pacientes asmáticos.

Por otro lado, dentro de los múltiples factores secretados por la MLVA, se encuentran diversos mediadores lipídicos, siendo la PGE<sub>2</sub> mayoritariamente producida por este tipo celular<sup>[260]</sup>. Esta prostaglandina contribuye a la modulación de la reactividad bronquial en presencia de fenómenos inflamatorios, siendo uno de sus mecanismos la inhibición de la expresión de genes que codifican para citocinas inflamatorias como IL-1<sup>[261]</sup>. Además, la PGE<sub>2</sub> es capaz de disminuir la proliferación de fibroblastos y los niveles de colágeno por inhibición de su síntesis, promoviendo además su degradación<sup>[262]</sup>.

Dado el destacado papel de la PGE<sub>2</sub> como broncoprotector, se evaluaron sus efectos sobre una línea de CMLB mediante el cultivo de este tipo celular con diversas concentraciones de PGE<sub>2</sub> sintética y/o agonistas y/o antagonistas de sus receptores pares. También se analizó el efecto de los sobrenadantes del EI de los diversos individuos del estudio sobre la proliferación de dicha línea muscular.

La PGE<sub>2</sub>, así como los agonistas de los receptores EP2 y EP4 (forma sintética), produjeron una importante inhibición de la proliferación de las CMLB, alcanzando el 80% de inhibición a las concentraciones más elevadas (Figura 39, apartado 4.10.2). A su vez, los ensayos con los antagonistas de dichos receptores, en los que se consiguió parte de la proliferación inicial,

demonstraron que la  $\text{PGE}_2$  actúa a través de estos receptores para producir el efecto inhibitorio sobre la proliferación (Figura 40, apartado 4.10.2). Cuando las células son incubadas con los sobrenadantes del esputo de los pacientes de BE, los cuales poseen una elevada concentración de  $\text{PGE}_2$ , se produjo un mayor porcentaje de inhibición de la proliferación que el que se observa en los cultivos con los sobrenadantes del esputo del grupo asmático (Figura 38, apartado 4.10.1).

En el caso de los ensayos con productos sintéticos, los mayores porcentajes se alcanzaron con la  $\text{PGE}_2$ , estando por encima de los valores obtenidos con los agonistas, Butaprost y 11-deoxi- $\text{PGE}_1$  (80,18% *vs* 38,77% y 73,78%, respectivamente) a la máxima concentración analizada ( $10^{-6}$  M).

Así, uno de los mecanismos que proponemos para explicar la ausencia de HRB en los pacientes con BE es la inhibición de la proliferación de las CMLB debido al aumento de  $\text{PGE}_2$ , lo que impediría el fenómeno de hiperplasia en este tipo celular que conduce a la obstrucción de las vías respiratorias, obstrucción característica de la patología asmática.

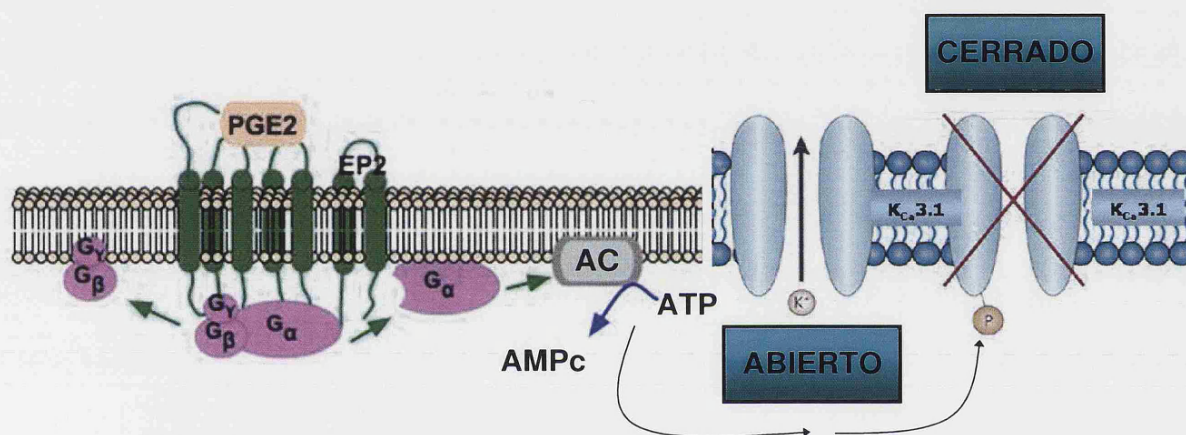
Numerosos son los artículos que ratifican la capacidad anti-proliferativa de la  $\text{PGE}_2$ <sup>[99,260]</sup>. Además, es claro el papel clave que desarrollan los receptores EP2 y EP4 en el proceso de la inhibición de la proliferación de las CMLB por parte de la  $\text{PGE}_2$ , ya que dichos efectos anti-proliferativos se considera que están mediados por la activación de la adenilato ciclasa y la formación de  $\text{AMPc}$ <sup>[260]</sup>, siendo EP2 y EP4 activadores directos de esta enzima. Dado que es el aumento de  $\text{AMPc}$  el elemento principalmente vinculado a la inhibición de la proliferación ya que es considerado un regulador negativo de este proceso<sup>[263]</sup>, y a la vista de los resultados obtenidos en los ensayos con la  $\text{PGE}_2$  y los agonistas sintéticos, ambos receptores parecen estar implicados cuando son estimulados con  $\text{PGE}_2$ .

De esta forma, la hipótesis que se demuestra en este trabajo es que las diferencias existentes entre asma y BE en relación a su fenotipo clínico se deban posiblemente, en gran medida, a los elevados niveles de  $\text{PGE}_2$  existentes en el foco inflamatorio de los pacientes con BE. Dicha prostaglandina, a través de sus receptores EP2 y EP4, disminuiría o frenaría la capacidad proliferativa de las células musculares bronquiales y, por tanto, la HRB.

Inicialmente, esta hipótesis podría no seguir la línea argumental de Brightling y colaboradores<sup>[34]</sup>, los cuales hallaron un elevado número de mastocitos infiltrando la musculatura bronquial de pacientes asmáticos, no existiendo dichos mastocitos en las muestras de pacientes con BE ni en los controles sanos. De esta forma, la infiltración mastocitaria de la musculatura lisa como origen o causa de la HRB, se ha propuesto como una importante y plausible teoría

convirtiendo, en la actualidad, en planteamientos prácticamente “invisibles” a los existentes previamente.

Sin embargo, este mismo grupo recientemente puso de manifiesto la gran importancia de la  $\text{PGE}_2$  y sus receptores, concretamente el receptor EP2, puesto que demostraron que dicho receptor es capaz de atenuar la migración de los mastocitos pulmonares<sup>[264]</sup>. La  $\text{PGE}_2$ , a través del receptor EP2 y sus efectos sobre la actividad de la adenilato ciclasa, actuaría sobre los canales de potasio  $\text{K}_{\text{Ca}}3.1$  presentes en la superficie de los mastocitos pulmonares. Dichos canales de potasio, al ser fosforilados tras la actividad de la adenilato ciclasa, se cierran lo que impide la migración de los mastocitos pulmonares hacia la musculatura lisa bronquial (Figura 42).

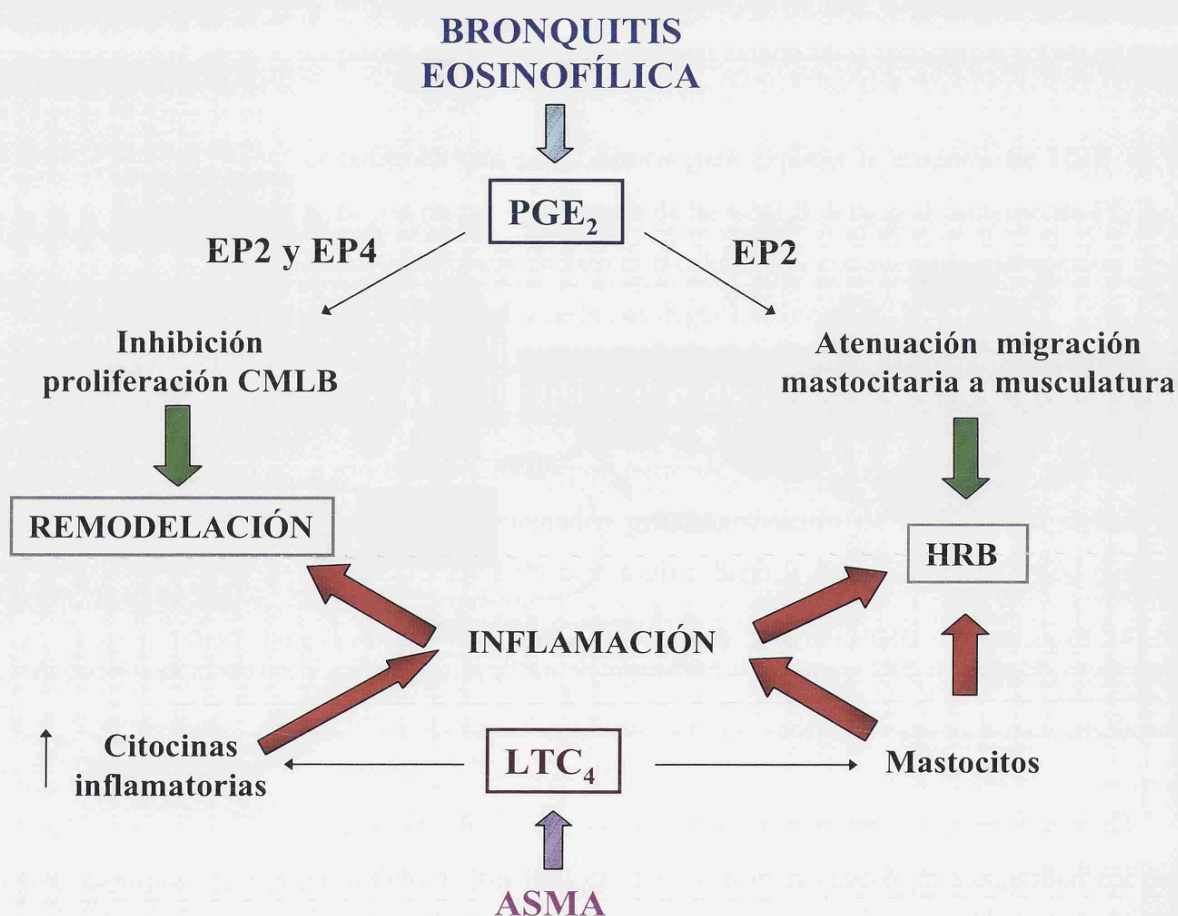


**Figura 42.** Esquema de la inhibición de la migración de los mastocitos mediada por la  $\text{PGE}_2$ . La unión de la  $\text{PGE}_2$  a través del receptor EP2 promueve la producción de AMPc lo que implica la liberación de fosfatos que fosforilarían los canales de  $\text{K}_{\text{Ca}}3.1$ , disminuyendo la migración de los mastocitos a la musculatura lisa.

De esta forma, si conjuntamos tanto los resultados obtenidos por Duffy y colaboradores como los hallazgos e hipótesis establecidos en este trabajo, se podría llegar a una explicación o hipótesis conjunta más completa. Así, la presencia de una mayor concentración de  $\text{PGE}_2$  en el foco inflamatorio de los pacientes con BE (observado en este estudio), y gracias a ese mecanismo mediado por EP2, el cual cerraría los canales de potasio, se explicaría la menor o inexistente presencia de mastocitos infiltrados en el pulmón en estos pacientes. Además, gracias a la actuación de la  $\text{PGE}_2$  a través no sólo de EP2, sino también de EP4, se inhibiría la proliferación masiva de la musculatura lisa y, por tanto la hiperplasia característica del proceso de remodelación. Por otro lado, la activación de EP2 conllevaría un incremento de AMPc lo que implicaría una inhibición de la degranulación de los mastocitos<sup>[264]</sup>. De esta forma, tanto el bloqueo de la migración mastocitaria como la reducción de la proliferación de la musculatura,

ambos procesos mediados por la  $PGE_2$ , incidirían sobre la HRB. Todo esto justificaría la menor gravedad clínica observada en los pacientes con BE, aunque bien es cierto que el grado de infiltración pulmonar mastocitaria en los pacientes de este estudio no se conoce.

Así, estos datos redundan en el efecto broncoprotector que desarrolla la  $PGE_2$ , efecto que se encuentra potenciado en la BE dados los altos niveles de dicho mediador (comparados con el grupo asmático) encontrados en este tipo de pacientes.



**Figura 43. Esquema de las patologías de estudio: bronquitis eosinofílica y asma.** Los niveles incrementados de  $PGE_2$  encontrados en el sobrenadante de los pacientes con BE podrían actuar atenuando la migración mastocitaria a la musculatura lisa bronquial así como inhibiendo la proliferación de dicha musculatura pudiendo disminuir, por tanto, la hiperreactividad bronquial así como los procesos de remodelación y obstrucción al flujo aéreo (flecha verde: disminución, flecha roja: incremento).

El hallazgo de elevados niveles de  $PGE_2$  en los pacientes con BE respecto a los individuos asmáticos supuso un punto clave en este estudio. A raíz de este resultado, el estudio de la ruta de síntesis de dicha prostaglandina mostró una regulación positiva de esta cascada enzimática,

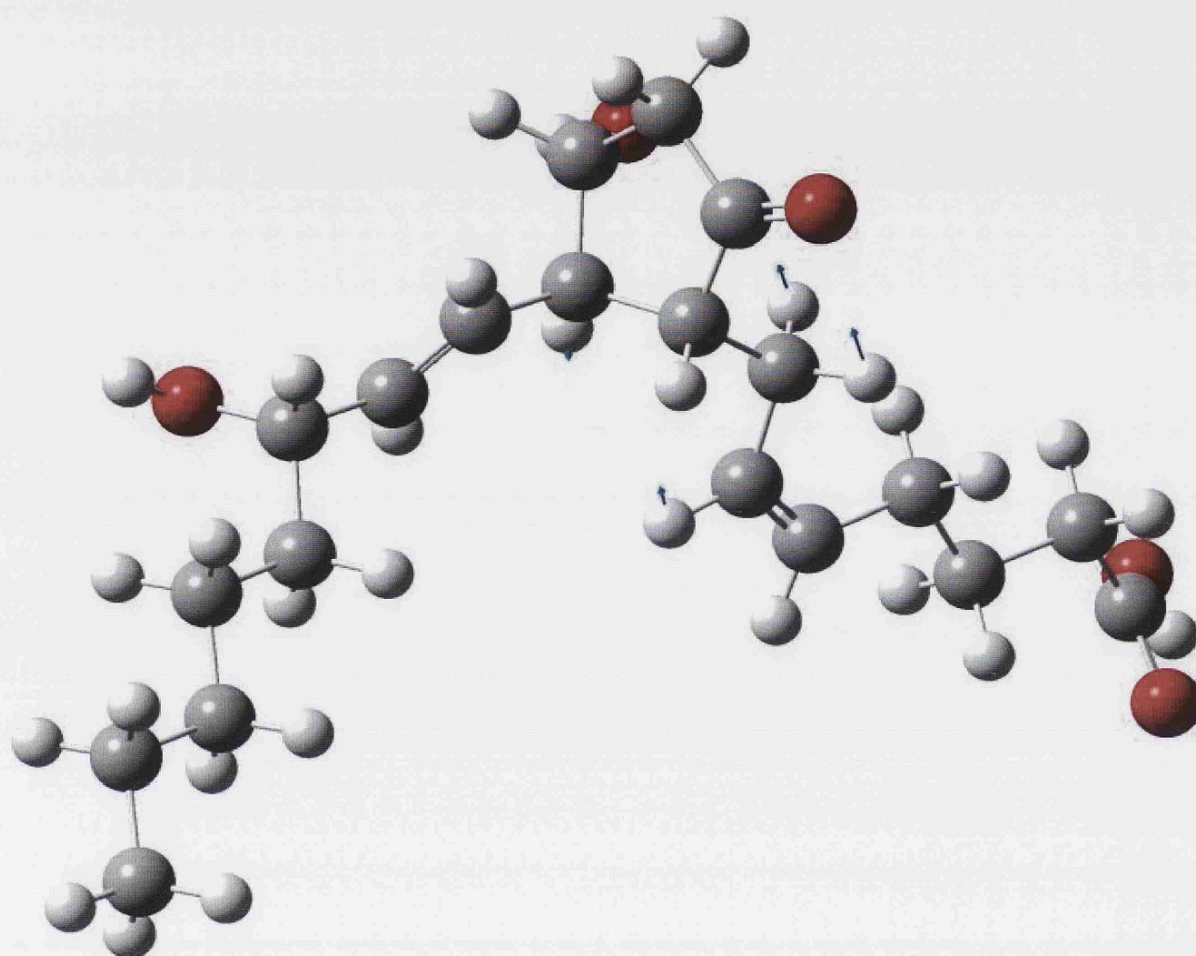
principalmente en las muestras de biopsias bronquiales. Además, se ha demostrado la función anti-proliferativa de la PGE<sub>2</sub> sobre las células musculares lisas bronquiales.

La PGE<sub>2</sub>, a través de sus receptores EP2 y EP4, inhibiría la proliferación de las CMLB, evitando de esta forma la hiperplasia muscular y, por tanto, la obstrucción variable al flujo aéreo tan característica de la patología asmática y ausente en la BE. Además, atenuaría la migración de los mastocitos hacia la musculatura lisa, lo que explicaría la ausencia de HRB característica de la BE.

De esta forma, los resultados de este estudio permitirían añadir al esquema clásico de algunos de los mecanismos que juegan un papel clave en el asma y la BE (Figura 43), la hipótesis (demostrada *in vitro*) que postula el importante papel que la PGE<sub>2</sub>, a través de sus receptores EP2 y EP4, desarrollaría en la inhibición de la proliferación de la musculatura lisa de las vías aéreas, pudiendo ser un importante elemento regulador a tener en cuenta en un futuro tratamiento para este tipo de patologías respiratorias.







## 6. *Conclusiones*





Los elevados niveles de  $\text{PGE}_2$  encontrados en el sobrenadante del esputo de los pacientes con bronquitis eosinofílica inciden sobre las células musculares lisas bronquiales, inhibiendo su capacidad proliferativa a través de sus receptores EP2 y EP4, lo que influirá en el proceso de remodelación así como en la obstrucción al flujo aéreo, características de gran importancia que repercuten en la perpetuación de la inflamación y, por tanto, en el menor grado de severidad encontrado en la bronquitis eosinofílica.

Estos resultados suponen una mejora en el conocimiento de los mecanismos patológicos de ambas enfermedades, abriendo una posible vía de aproximación terapéutica y siendo la  $\text{PGE}_2$ , así como las enzimas que participan en su ruta de síntesis, posibles dianas de actuación.

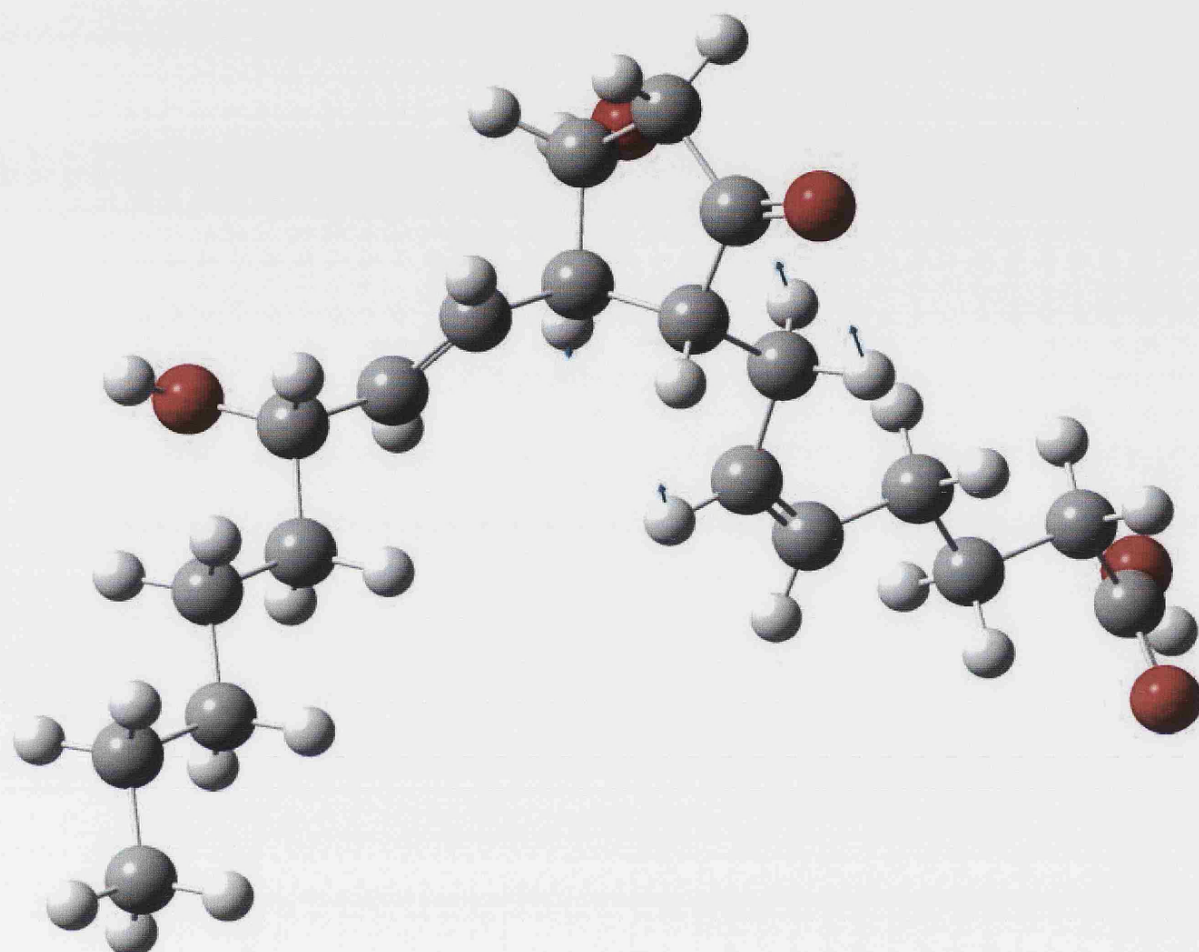
Esta conclusión principal se sustenta en las siguientes conclusiones parciales:

- 1. El cociente de los niveles de  $\text{LTC}_4$  y  $\text{PGE}_2$  ( $\text{LTC}_4/\text{PGE}_2$ ) en el sobrenadante del esputo inducido se encuentra disminuido en el grupo de BE debido al incremento de la concentración de  $\text{PGE}_2$ , estando prácticamente ausente en el sobrenadante de los individuos asmáticos.
- 2. Tanto en la muestra de esputo inducido como en los eosinófilos circulantes así como en las biopsias bronquiales, los pacientes con bronquitis eosinofílica expresan más receptores EP2 y EP4 que los individuos asmáticos. El incremento de la expresión de estos receptores en el grupo de BE justifica una mayor actuación de la  $\text{PGE}_2$  en estos pacientes, con los consiguientes resultados beneficiosos.
- 3. La  $\text{PGE}_2$  disminuye la proliferación de las células musculares lisas bronquiales, inhibiendo la hiperplasia muscular, importante factor en el desarrollo de la obstrucción al flujo aéreo.

Otras conclusiones de este trabajo son las siguientes:

- 4. El análisis del esputo inducido puede establecerse como muestra estandarizada en la práctica clínica dado su fácil manejo y siendo de gran utilidad en la evaluación del estatus inflamatorio existente en el área de lesión.

- 5. El infiltrado celular inflamatorio presente en el esputo inducido es similar entre ambas patologías, aunque el porcentaje de eosinófilos es ligeramente superior en los pacientes con bronquitis eosinofílica (BE), siendo el patrón de activación de este tipo celular diferente entre ambos grupos de pacientes.
- 6. Tanto el grupo de bronquitis eosinofílica como el de asma presentan un patrón de citocinas Th2 similar. Sin embargo, el grupo de bronquitis eosinofílica posee niveles de citocinas Th1 inmunorreguladoras más elevados que los observados en los pacientes asmáticos, mostrando así una mayor capacidad de respuesta ante estímulos pro-inflamatorios.
- 7. Los pacientes con BE presentan una regulación positiva de la síntesis de  $PGE_2$  en las biopsias bronquiales, las cuales engloban diversas estirpes celulares que actúan como importantes fuentes de producción de este mediador lipídico, lo que podría contribuir a atenuar la inflamación.



## *7. Bibliografía*



- [1] Quirce S, Pérez E, Carrillo T. Capítulo 4: Mecanismos patogénicos. En Quirce S, Carrillo T, Olaguibel JM. Asma. Volúmen I: Ciencia básica y patogenia, 1ª edición, Barcelona, MRA ediciones; 2004. págs. 57-74.
- [2] Moffatt MF. Genes in asthma; new genes and new ways. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008; 8: 411-417.
- [3] Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy* 2008; 38: 872-897.
- [4] Nauta AJ, Engels F, Knippels LM, Garssen J, Kijkamp FP, Redegeld FA. Mechanisms of allergy and asthma. *Eur J Pharmacol* 2008; 585: 354-360.
- [5] Romieu I. Nutrition and lung health. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005; 9 (4): 362-374.
- [6] Martinez FD. Genes, environments, development and asthma: a reappraisal. *Eur Respir J* 2007; 29: 179-184.
- [7] D'Amato G, Cecchi L. Effects of climate change on environmental factors in respiratory allergic diseases. *Clin Exp Allergy* 2008; 38: 1264-1274.
- [8] Ciencewicky J, Trivedi S, Kleeberger SR. Oxidants and the pathogenesis of lung diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122: 456-468.
- [9] National Asthma Education and Prevention Program: Expert Panel Report II. Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma, Bethesda, United States Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, National Heart, Lung and Blood Institute, 1997 publ No 97-4051A.
- [10] Barnes KC. Evidence for common genetic elements in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106 (5 Suppl.): S192-S200.
- [11] Sanz ML, García MC. Capítulo 3: Inmunobiología del asma. En Quirce S, Carrillo T, Olaguibel JM. Asma. Volúmen I: Ciencia básica y patogenia, 1ª edición, Barcelona, MRA ediciones; 2004. págs. 39-56.

- [12] Vignola AM, Gagliardo R, Guerrera D, Chiappara G, Chanez P, Bousquet J, Bonsignore G. New evidence of inflammation in asthma. *Thorax* 2000; 55 (Suppl 2): S59-S60.
- [13] Kay AB. Helper (CD4+) T cells and eosinophils in allergy and asthma. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145 (2 Pt 2): S22-S26.
- [14] Ngoc LP, Gold DR, Tzianabos AO, Weiss ST, Celedón JC. Cytokines, allergy and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005; 5: 161-166.
- [15] Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma: from bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1720-1745.
- [16] Global strategy for asthma management and prevention. Update from NHLB/WHO Workshop Report 1995. GINA, Revised 2006 Medical Communications Resources, B-42319. <http://www.ginasthma.com>
- [17] Gibson PG, Dolovich J, Denburg J, Ramsdale EH, Hargreave FE. Chronic cough: eosinophilic bronchitis without asthma. *Lancet* 1989; 17 (1): 1346-1348.
- [18] Gibson PG, Hargreave FE, Girgis-Gabardo A, Morris M, Denburg JA, Dolovich J. Chronic cough with eosinophilic bronchitis: examination for variable airflow obstruction and response to corticosteroid. *Clin Exp Allergy* 1995; 25: 127-132.
- [19] Brightling CE, Pavord ID. Eosinophilic bronchitis: what is it and why is it important? *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 4-6.
- [20] Brightling CE, Ward R, Goh KL, Wardlaw AJ, Pavord ID. Eosinophilic bronchitis is an important cause of chronic cough. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 406-410.
- [21] Quirce S. Capítulo 13: Bronquitis eosinofílica. En Quirce S, Carrillo T, Olaguibel JM. Asma. Volumen I: Ciencia básica y patogenia, 1ª edición, Barcelona, MRA ediciones; 2004. págs. 221-226.
- [22] Brightling CE, Pavord ID. Eosinophilic bronchitis: an important cause of prolonged cough. *Ann Med* 2000; 32: 446-451.

- [23] Brightling CE, Ward R, Wardlaw AJ, Pavord ID. Airway inflammation, airway responsiveness and cough before and after inhaled budesonide in patients with eosinophilic bronchitis. *Eur Respir J* 2000; 15: 682-686.
- [24] Ayik SÖ, Basoglu ÖK, Erdinç M, Bor S, Veral A, Bilgen C. Eosinophilic bronchitis as a cause of chronic cough. *Respir Med* 2003; 97: 695-701.
- [25] Fujimura M, Ogawa H, Yasui M, Matsuda T. Eosinophilic tracheobronchitis and airway cough hypersensitivity in chronic non-productive cough. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 41-47.
- [26] Lemi re C, Efthimiadis LMT, Hargreave FE. Occupational eosinophilic bronchitis without asthma: An unknown occupational airway disease. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100: 852-853.
- [27] Gibson PG, Fujimura M, N mi A. Eosinophilic bronchitis: clinical manifestations and implications for treatment. *Thorax* 2002; 57: 178-182.
- [28] Irwin RS, Curley FJ, French CL. Chronic cough. The spectrum and frequency of causes, key components of the diagnostic evaluation, and outcome of specific therapy. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141 (3): 640-647.
- [29] Poe RH, Harder RV, Israel RH, Kallay MC. Chronic persistent cough. Experience in diagnosis and outcome using an anatomic diagnostic protocol. *Chest* 1989; 95: 723-728.
- [30] Chung KF. Future directions in chronic cough: mechanisms and antitussives. *Chron Respir Dis* 2007; 4: 159-165.
- [31] Brightling CE, Symon FA, Birring SS, Bradding P, Pavord ID, Wardlaw AJ. T<sub>H</sub>2 cytokine expression in bronchoalveolar lavage fluid T lymphocytes and bronchial submucosa is a feature of asthma and eosinophilic bronchitis. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 899-905.
- [32] Brightling CE, Ward R, Woltmann G, Bradding P, Sheller JR, Dworski R, Pavord ID. Induced sputum inflammatory mediator concentrations in eosinophilic bronchitis and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 878-882.
- [33] Brightling CE, Symon FA, Birring SS, Bradding P, Wardlaw AJ, Pavord ID. Comparison of airway immunopathology of eosinophilic bronchitis and asthma. *Thorax* 2003; 58: 528-532.

- [34] Brightling CE, Bradding P, Symon FA, Holgate ST. Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med* 2002; 346 (22): 1699-1705.
- [35] Brightling CE, Bradding P, Pavord ID, Wardlaw AJ. New insights into the role of the mast cell in asthma. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 550-556.
- [36] Brightling CE. Chronic cough due to nonasthmatic eosinophilic bronchitis. ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2006; 129: 116S-121S.
- [37] Brightling CE, Bradding P. The re-emergence of the mast cell as a pivotal cell in asthma pathogenesis. *Curr Allergy Asthma Rep* 2005; 5: 130-135.
- [38] Kanazawa H, Nomura S, Yoshikawa J. Role of microvascular permeability on physiologic differences in asthma and eosinophilic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: 1125-1130.
- [39] Demoly P, Maly FE, Mautino G, Grad S, Gougat C, Sahla H, Godard P, Bousquet J. VEGF levels in asthmatic airways do not correlate with plasma extravasation. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 1390-1394.
- [40] Quirce S. Eosinophilic bronchitis in the workplace. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; 4: 87-91.
- [41] Chung KF. Pathophysiology and therapy of chronic cough. *Minerva Med* 2004; 95: 29-40.
- [42] Del Pozo V, Lahoz C. Capítulo 7: Eosinófilos. En Quirce S, Carrillo T, Olaguibel JM. Asma. Volumen I: Ciencia básica y patogenia, 1ª edición, Barcelona, MRA ediciones; 2004. págs. 119-131.
- [43] Brito F, Yamazaki MA, Espinosa S, Vázquez O, Huerta J, Berrón R. Eosinófilos: revisión de la literatura. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas* 2003; 12 (2): 56-62.
- [44] Scott KA, Wardlaw AJ. Eosinophilic airway disorders. *Semin Respir Crit Care Med* 2006; 27: 128-133.



- [45] Lampinen M, Carlson M, Hakansson LD, Venge P. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. *Allergy* 2004; 59: 793-805.
- [46] Rothenberg ME. Eosinophilia. *N Engl J Med* 1998; 338 (22): 1592-1600.
- [47] Stirling RG, Van Rensen EL, Barnes PJ, Chung KF. Interleukin-5 induces CD34<sup>+</sup> eosinophil progenitor mobilization and eosinophil CCR3 expression in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1403-1409.
- [48] Gleich GJ. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 651-663.
- [49] Busse WW, Lemanske RF. Asthma. *N Engl J Med* 2001; 344 (5): 350-362.
- [50] Walsh GM, Sexton DW, Blaylock MG. Corticosteroids, eosinophils and bronchial epithelial cells: new insights into the resolution of inflammation in asthma. *J Endocrinol* 2003; 178: 37-43.
- [51] Kay AB, Phipps S, Robinson DS. A role for eosinophils in airway remodelling in asthma. *Trends Immunol* 2004; 25: 477-482.
- [52] Kay AB. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Trends Mol Med* 2005; 11 (4): 148-152.
- [53] Puxeddu I, Levi-Schaffer F. Mast cells and eosinophils: the "hallmark" of asthma. *Paediatr Respir Rev* 2004; 5 (Suppl A): S31-S34.
- [54] Munitz A, Levi-Schaffer F. Eosinophils: "new" roles for "old" cells. *Allergy* 2004; 59: 268-275.
- [55] Shi HZ, Xiao CQ, Li CQ, Mo XY, Yang QL, Leng J, Chen YQ. Endobronchial eosinophils preferentially stimulate T helper cell type 2 responses. *Allergy* 2004; 59: 428-435.
- [56] Del Pozo V, De Andrés B, Martín E, Cárdena B, Fernández JC, Gallardo S, Tramón P, Leyva-Cobián F, Palomino P, Lahoz C. Eosinophil as antigen-presenting cell: activation of T cell

- clones and T cell hybridoma by eosinophils after antigen processing. *Eur J Immunol* 1992; 22 (7): 1919-1925.
- [57] Takatsu K, Nakajima H. IL-5 and eosinophilia. *Curr Opin Immunol* 2008; 20: 288-294.
- [58] Foster PS, Mould AW, Yang M, Mackenzie J, Mattes J, Hogan SP, Mahalingam S, Mckenzie AN, Rothenberg ME, Young IG, Matthaei KI, Webb DC. Elemental signals regulating eosinophil accumulation in the lung. *Immunol Rev* 2001; 179: 173-181.
- [59] Bisgaard H. Role of leukotrienes in asthma pathophysiology. *Pediatr Pulmonol* 2000; 30: 166-176.
- [60] Samuelsson B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* 1983; 220 (4597): 568-575.
- [61] Capra V. Molecular and functional aspects of human cysteinyl leukotriene receptors. *Pharmacol Res* 2004; 50: 1-11.
- [62] Bisgaard H. Pathophysiology of the cysteinyl leukotrienes and effects of leukotriene receptor antagonists in asthma. *Allergy* 2001; 56 (Suppl. 66): 7-11.
- [63] Peters-Golden M. Expanding roles for leukotrienes in airway inflammation. *Curr Allergy Asthma Rep* 2008; 8 (4): 367-373
- [64] Kanaoka Y, Boyce JA. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: cellular distribution and function in immune and inflammatory responses. *J Immunol* 2004; 173: 1503-1510.
- [65] Capra V, Ambrosio M, Riccioni G, Rovati GE. Cysteinyl-leukotriene receptor antagonists: present situation and future opportunities. *Curr Med Chem* 2006; 13: 3213-3226.
- [66] Peters-Golden M, Henderson WR. Leukotrienes. *N Engl J Med* 2007; 357: 1841-1854.
- [67] Rovati GE, Capra V. Cysteinyl-leukotriene receptors and cellular signals. *ScientificWorldJournal* 2007; 7: 1375-1392.
- [68] Kim ND, Luster AD. Regulation of immune cells by eicosanoid receptors. *ScientificWorldJournal* 2007; 7: 1307-1328.

- [69] Wenzel SE. The role of leukotrienes in asthma. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003; 69 (2-3): 145-155.
- [70] Holgate ST, Peters-Golden M, Panettieri RA, Henderson WR. Roles of cysteinyl leukotrienes in airway inflammation, smooth muscle function and remodeling. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 11 (1): S18-36.
- [71] Henderson WR Jr, Lewis DB, Albert RK, Zhang Y, Lamm WJ, Chiang GK, Jones F, Eriksen P, Tien YT, Jonas M, Chi EY. The importance of leukotrienes in airway inflammation in a mouse model of asthma. *J Exp Med* 1996; 184 (4): 1483-1494.
- [72] Von Euler US. A depressor substance in the vesicular gland. *J Physiology* 1935; 84: 21P.
- [73] Clària J. Cyclooxygenase-2 biology. *Curr Pharm Des* 2003; 9: 2177-2190.
- [74] Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol* 2002; 23 (3): 144-150.
- [75] Ueno N, Takegoshi Y, Kamei D, Kudo I, Murakami M. Coupling between cyclooxygenases and terminal prostanoid synthases. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338: 70-76.
- [76] Warner TD, Mitchell JA. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *FASEB J* 2004; 18: 790-804.
- [77] Park GY, Christman JW. Involvement of cyclooxygenase-2 and prostaglandins in the molecular pathogenesis of inflammatory lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 290 (5): L797-L805.
- [78] Brock TG, Peters-Golden M. Activation and regulation of cellular eicosanoid biosynthesis. *ScientificWorldJournal* 2007; 7: 1273-1284.
- [79] Honda K, Arima M, Cheng G, Taki S, Hirata H, Eda F, Fukushima F, Yamaguchi B, Hatano M, Tokuhisa T, Fukuda T. Prostaglandin D<sub>2</sub> reinforces Th2 type inflammatory responses of airways to low-dose antigen through bronchial expression of macrophage-derived chemokine. *J Exp Med* 2003; 198 (4): 533-543.

- [80] Chiba T, Kanda A, Ueki S, Ito W, Yamaguchi K, Kamada Y, Takeda M, Tanigai T, Oyamada H, Kayaba H, Chihara J. Possible novel receptor for PGD<sub>2</sub> on human bronchial epithelial cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2007; 143 (Suppl. 1): 23-27.
- [81] Watanabe K. Prostaglandin F synthase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002; 68-69: 401-407.
- [82] Murakami M, Naraba H, Tanioka T, Semmyo N, Nakatani Y, Kokima F, Ikeda T, Fueki M, Ueno A, Oh-ishi S, Kudo I. Regulation of prostaglandin E<sub>2</sub> biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E<sub>2</sub> synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 2000; 275 (4): 32783-32792.
- [83] Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties and functions. *Physiol Rev* 1999; 79 (4): 1193-1226.
- [84] Sugimoto Y, Narumiya S. Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem* 2007; 282 (16): 11613-11617.
- [85] Vancheri C, Mastruzzo C, Sortino MA, Crimi N. The lung as a privileged site for the beneficial actions of PGE<sub>2</sub>. *Trends Immunol* 2004; 25 (1): 40-46.
- [86] Burgess JK, Ge Q, Boustany S, Black JL, Johnson PR. Increased sensitivity of asthmatic airway smooth muscle cells to prostaglandin E<sub>2</sub> might be mediated by increased numbers of E-prostanoid receptors. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 876-881.
- [87] Serhan CN, Levy B. Success of prostaglandin E<sub>2</sub> in structure-function is a challenge for structure-based therapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100 (15): 8609-8611.
- [88] Phipps RP, Stein SH, Roper RL. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. *Immunol Today* 1991; 12 (10): 349-352.
- [89] Eberhart CE, Dubois RN. Eicosanoids and the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 1995; 109 (1): 285-301.
- [90] Tsuboi K, Sugimoto Y, Ichikawa A. Prostanoid receptor subtypes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002; 68-69: 535-556.

- [91] Matsuoka T, Narumiya S. Prostaglandin receptor signaling in disease. *ScientificWorldJournal* 2007; 7: 1329-1347.
- [92] Ozaki T, Rennard SI, Crystal RG. Cyclooxygenase metabolites are compartmentalized in the human lower respiratory tract. *J Appl Physiol* 1987; 62 (1): 219-222.
- [93] Hartert TV, Dworski RT, Mellen BG, Oates JA, Murray JJ, Sheller JR. Prostaglandin E<sub>2</sub> decreases allergen-stimulated release of prostaglandin D<sub>2</sub> in airways of subjects with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 637-640.
- [94] Tilley SL, Coffman TM, Koller BH. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J Clin Invest* 2001; 108: 15-23.
- [95] Nguyen M, Solle M, Audoly LP, Tilley SL, Stock JL, McNeish JD, Coffman TM, Dombrowicz D, Koller BH. Receptors and signalling mechanisms required for prostaglandin E<sub>2</sub>-mediated regulation mast cell degranulation and IL-6 production. *J Immunol* 2002; 169: 4586-4593.
- [96] Goulet JL, Pace AJ, Key ML, Byrum RS, Nguyen M, Tilley SL, Morham SG, Langenbach R, Stock JL, McNeish JD, Smithies O, Coffman TM, Koller BH. E-prostanoid-3 receptors mediate the proinflammatory actions of prostaglandin E<sub>2</sub> in acute cutaneous inflammation. *J Immunol* 2004; 173: 1321-1326.
- [97] Harizi H, Gualde N. The impact of eicosanoids on the crosstalk between innate and adaptive immunity: the key roles of dendritic cells. *Tissue Antigens* 2005; 65: 507-514.
- [98] Harizi H, Juzan M, Pitard V, Moreau JF, Gualde N. Cyclooxygenase-2-issued prostaglandin E<sub>2</sub> enhances the production of endogenous IL-10, which down-regulates dendritic cell functions. *J Immunol* 2002; 168: 2255-2263.
- [99] Gauvreau GM, Watson RM, O'Byrne PM. Protective effects of inhaled PGE<sub>2</sub> on allergen-induced airway responses and airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 31-36.
- [100] Pavord ID, Tattersfield AE. Bronchoprotective role for endogenous prostaglandin E<sub>2</sub>. *Lancet* 1994; 344: 436-438.

- [101] Peters SP, Schulman ES, Schleimer RP, MacGlashan DW Jr, Newball HH, Lichtenstein LM. Dispersed human lung mast cells. Pharmacologic aspects and comparison with human lung tissue fragments. *Am Rev Respir Dis* 1982; 126 (6): 1034-1039.
- [102] Alam R, Dejernatt A, Stafford S, Forsythe PA, Kumar D, Grant JA. Selective inhibition of the cutaneous late but not immediate allergic response to antigens by misoprostol, a PGE analog. Results of a double-blind, placebo-controlled randomized study. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 1066-1070.
- [103] Sturm EM, Schratl P, Schuligoi R, Konya V, Sturm GJ, Lippe IT, Peskar BA, Heinemann A. Prostaglandin E<sub>2</sub> inhibits eosinophil trafficking through E-prostanoid 2 receptors. *J Immunol* 2008; 181: 7273-7283
- [104] Pène J, Rousset F, Brière F, Chrétien I, Bonnefoy JY, Spits H, Yokota T, Arai N, Arai K, Banchereau J et al. IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin a and suppressed by interferons gamma and alpha and prostaglandin E2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85 (18): 6880-6884.
- [105] Takayama K, García-Cardena G, Sukhova GK, Comander J, Gimbrone MA Jr, Libby P. Prostaglandin E<sub>2</sub> suppresses chemokine production in human macrophages through the EP4 receptor. *J Biol Chem* 2002; 277 (46): 44147-44154.
- [106] Pierzchalska M, Szabó Z, Sanak M, Soja J, Szczeklik A. Deficient prostaglandin E<sub>2</sub> production by bronchial fibroblasts of asthmatic patients, with special reference to aspirin-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 1041-1048.
- [107] Kay LJ, Yeo WW, Peachell PT. Prostaglandin E<sub>2</sub> activates EP<sub>2</sub> receptors to inhibit human lung mast cell degranulation. *Br J Pharmacol* 2006; 147: 707-713.
- [108] Seow CY, Schellenberg RR, Paré PD. Structural and functional changes in the airway smooth muscle of asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: S179-S186.
- [109] Jeffery PK. Remodeling and inflammation of bronchi in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2004; 1: 176-183.
- [110] Sumi Y, Hamid Q. Airway remodeling in asthma. *Allergol Int* 2007; 56: 341-348.

- [111] Olaguibel JM, Álvarez Puebla MJ. Capítulo 12: Remodelación de la vía respiratoria. En Quirce S, Carrillo T, Olaguibel JM. Asma. Volumen I: Ciencia básica y patogenia, 1ª edición, Barcelona, MRA ediciones; 2004. págs. 211-220.
- [112] Tran T, Halayko AJ. Extracellular matrix and airway smooth muscle interactions: a target for modulating airway wall remodelling and hyperresponsiveness. *Can J Physiol Pharmacol* 2007; 85: 666-671.
- [113] Gil FR, Lauzon AM. Smooth muscle molecular mechanics in airway hyperresponsiveness and asthma. *Can J Physiol Pharmacol* 2007; 85: 133-140.
- [114] Tagaya E, Tamaoki J. Mechanisms of airway remodeling in asthma. *Allergol Int* 2007; 56: 331-340.
- [115] Ebina M, Takahashi T, Chiba T, Motomiya M. Cellular hypertrophy and hyperplasia of airway smooth muscles underlying bronchial asthma. A 3-D morphometric study. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148 (3): 720-726.
- [116] James A. Remodelling of airway smooth muscle in asthma: what sort do you have? *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 703-707.
- [117] Yamauchi K. Airway remodeling in asthma and its influence on clinical pathophysiology. *Tohoku J Exp Med* 2006; 209: 75-87.
- [118] Panettieri RA Jr. Airway smooth muscle: immunomodulatory cells? *Allergy Asthma Proc* 2004; 25 (6): 381-386.
- [119] White E. Life, death and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev* 1996; 10: 1-15.
- [120] Kuwano K. Epithelial cell apoptosis and lung remodeling. *Cell Mol Immunol* 2007; 4 (6): 419-429.
- [121] Todo-Bom A, Mota Pinto A, Alves V, Vale Pereira S, Santos Rosa M. Apoptosis and asthma in the elderly. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2007; 17 (2): 107-112.

- [122] Spinozzi F, De Benedictis D, De Benedictis FM. Apoptosis, airway inflammation and anti-asthma therapy: from immunobiology to clinical application. *Pediatr Allergy Immunol* 2008; 19: 287-295.
- [123] Truong-Tran AQ, Grosser D, Ruffin RE, Murgia C, Zalewski PD. Apoptosis in the normal and inflamed airway epithelium: role of zinc in epithelial protection and procaspase-3 regulation. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 1459-1468.
- [124] Haslett C. Granulocyte apoptosis and its role in the resolution and control of lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: S5-S11.
- [125] Bratton DL, Fadok VA. "Their's but to do and die": eosinophil longevity in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 555-558.
- [126] Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- $\beta$ , PGE2 and PAF. *J Clin Invest* 1998; 101: 890-898.
- [127] Walsh GM. Eosinophil apoptosis: mechanisms and clinical relevance in asthmatic and allergic inflammation. *Br J Haematol* 2000; 111: 61-67.
- [128] Uller L, Persson CG, Erjefält JS. Resolution of airway disease: removal of inflammatory cells through apoptosis, egression or both? *Trends Pharmacol Sci* 2006; 27 (9): 461-466.
- [129] Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barneón G, Ghavanian N, Enander I, Venge P, Ahlstedt S, Simony-Lafontaine J, Godard P et al. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med* 1990; 323 (15): 1033-1039.
- [130] Haslett C. Granulocyte apoptosis and inflammatory disease. *Br Med Bull* 1997; 53 (3): 669-683.
- [131] Álvarez Puebla MJ, Olaguibel JM. Capítulo 3: Evaluación de la inflamación en el asma: esputo inducido y condensado de aire exhalado. En Quirce S, Carrillo T, Olaguibel JM. Asma. Volumen I: Ciencia básica y patogenia, 1ª edición, Barcelona, MRA ediciones; 2004. págs. 49-62.



- [132] Pavord ID. Sputum induction to assess airway inflammation: is it an inflammatory stimulus? *Thorax* 1998; 53: 79-80.
- [133] Robroeks CM, van de Kant KD, Jöbsis Q, Hendriks HJ, van Gent R, Wouters EF, Damoiseaux JG, Bast A, Wodzig WK, Dompeling E. Exhaled nitric oxide and biomarkers in exhaled breath condensate indicate the presence, severity and control of childhood asthma. *Clin Exp Allergy* 2007; 37: 1303-1311.
- [134] Vass G, Huszár E, Barát E, Valyon M, Kiss D, Péntes I, Augusztinovicz M, Horváth I. Comparison of nasal and oral inhalation during exhaled breath condensate collection. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 850-855.
- [135] Turner S. Exhaled nitric oxide in the diagnosis and management of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008; 8: 70-76.
- [136] Zapol WM, Rimar S, Gillis N, Marletta M, Bosken CH. Nitric oxide and the lung. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149 (5): 1375-1380.
- [137] Lemiére C. Induced sputum and exhaled nitric oxide as noninvasive markers of airway inflammation from work exposures. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007; 7: 133-137.
- [138] Zeidler MR, Kleerup EC, Tashkin DP. Exhaled nitric oxide in the assessment of asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2003; 10:31-36.
- [139] Pendharkar S, Mehta S. The clinical significance of exhaled nitric oxide in asthma. *Can Respir J* 2008; 15 (2): 99-106.
- [140] Schneider A, Tilemann L, Schermer T, Gindner L, Laux G, Szecsenyi J, Meyer FJ. Diagnosing asthma in general practice with portable exhaled nitric oxide measurement- results of a prospective diagnostic study. *Resp Res* 2009; 3: 10-15.
- [141] de Mir Messa I, Moreno Galdó A, Cobos Barrosos N, Gartner S, Martín de Vicente C, Liñán Cortés S. Exhaled nitric oxide in children under 4 years of age with recurrent bronchitis. *Arch Bronconeumol* 2009; 45 (9): 442-448.

- [142] Silvestri M, Spallarossa D, Battistini E, Brusasco V, Rossi GA. Dissociation between exhaled nitric oxide and hyperresponsiveness in children with mild intermittent asthma. *Thorax* 2000; 55: 484-488.
- [143] Hahn PY, Morgenthaler TI, Lim KG. Use of exhaled nitric oxide in predicting response to inhaled corticosteroids for chronic cough. *Mayo Clin Proc* 2007; 82 (11): 1350-1355.
- [144] Prieto L, Ferrer A, Ponce S, Palop J, Marín J. Exhaled nitric oxide measurement is not useful for predicting the response to inhaled corticosteroids in subjects with chronic cough. *Chest* 2009; 136 (3): 816-822.
- [145] Motomura C, Odajima H, Tezuka J, Murakami Y, Moriyasu Y, Kando N, Taba N, Hayashi D, Okada K, Nishima S. Effect of age on relationship between exhaled nitric oxide and airway hyperresponsiveness in asthmatic children. *Chest* 2009; 136 (2): 519-525.
- [146] Bickerman HA, Sproul EE, Barach AL. An aerosol method of producing bronchial secretions in human subjects: a clinical technique for the detection of lung cancer. *Dis Chest* 1958; 33: 347-362.
- [147] Lacy P, Lee JL, Vethanayagam D. Sputum analysis in diagnosis and management of obstructive airway diseases. *Ther Clin Risk Manag* 2005; 1 (3): 169-179.
- [148] Pavord ID, Pizzichini MM, Pizzichini E, Hargreave FE. The use of induced sputum to investigate airway inflammation. *Thorax* 1997; 52: 498-501.
- [149] Jayaram L, Parameswaran K, Sears MR, Hargreave FE. Induced sputum cell counts: their usefulness in clinical practice. *Eur Respir J* 2000; 16: 150-158.
- [150] Vlachos-Mayer H, Leigh R, Sharon RF, Hussack P, Hargreave FE. Success and safety of sputum induction in the clinical setting. *Eur Respir J* 2000; 16: 997-1000.
- [151] Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Hargreave FE, Dolovich J. Measurement of inflammatory indices in induced sputum: effects of selection of sputum to minimize salivary contamination. *Eur Respir J* 1996; 9: 1174-1180.

- [152] Popov TA, Pizzichini MM, Pizzichini E, Kolendowicz R, Punthakee Z, Dolovich J, Hargreave FE. Some technical factors influencing the induction of sputum for cell analysis. *Eur Respir J* 1995; 8: 559-565.
- [153] Efthimiadis A, Pizzichini MM, Pizzichini E, Dolovich J, Hargreave FE. Induced sputum cell and fluid-phase indices of inflammation: comparison of treatment with dithiothreitol vs phosphate-buffered saline. *Eur Respir J* 1997; 10: 1336-1340.
- [154] Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg JA, Hargreave FE, Dolovich H. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 1992; 47: 25-29.
- [155] Hadjicharalambous C, Dent G, May RD, Handy RL, Anderson IK, Davies DE, Djukanovic R. Measurement of eotaxin (CCL11) in induced sputum supernatants: validation and detection in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 657-662.
- [156] Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Evans S, Morris MM, Squillace D, Gleich GJ, Dolovich J, Hargreave FE. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 308-317.
- [157] Sastre B, Fernández-Nieto M, Mollá R, López E, Lahoz C, Sastre J, del Pozo V, Quirce S. Increased prostaglandin E<sub>2</sub> levels in the airway of patients with eosinophilic bronchitis. *Allergy* 2008; 63: 58-66.
- [158] Domínguez Ortega J, León F, Alonso Llamazares A, Roldán E, Robledo T, Agustín P, Bootello A, Martínez-Cócera C. The effect of dithiothreitol on VLA-4 detection in peripheral blood and induced sputum cells. *Allergol Immunopathol (Madrid)* 2002; 30 (4): 203-208.
- [159] Pellegrino R, Viegi G, Brusasco V, Crapo RO, Burgos F, Casaburi R, Coates A, van der Grinten CPM, Gustafsson P, Hankinson J, Jensen R, Johnson DC, MacIntyre N, McKay R, Miller MR, Navajas D, Pedersen OF, Wanger J. Interpretative strategies for lung function tests. *Eur Respir J* 2005; 26: 948-968.
- [160] Gilbert R, Auchincloss JH. What is a "restrictive" defect? *Arch Intern Med* 1986; 146 (9): 1779-1781.

- [161] Kratz A, Lewandrowski KB. Normal reference laboratory values. *N Engl J Med* 1998; 339 (15): 1063-1072.
- [162] Spanevello A, Confalonieri M, Sulotto F, Romano F, Balzano G, Migliori GB, Bianchi A, Michetti G. Induced sputum cellularity. Reference values and distribution in normal volunteers. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1172-1174.
- [163] Hallstrand TS, Chi EY, Singer AG, Gelb MH, Henderson WR Jr. Secreted phospholipase A<sub>2</sub> group X overexpression in asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176: 1072-1078.
- [164] Buyan N, Hasanoglu E, Oguz A, Ercan S. The role of plasma arachidonic acid metabolites in the pathogenesis and the prognosis of Henoch-Schönlein purpura. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1994; 50 (6): 353-356.
- [165] Fernández-Nieto M, Sastre B, Sastre J, Lahoz C, Quirce S, Madero MF, del Pozo V. Changes in sputum eicosanoids and inflammatory markers after inhalation challenges with occupational agents. *Chest* 2009; 136: 1308-1315.
- [166] Profita M, Sala A, Bonanno A, Riccobono I, Siena L, Melis MR, Di Giorgi R, Mirabella F, Gjomarkaj M, Bonsignore G, Vignola AM. Increased prostaglandin E<sub>2</sub> concentrations and cyclooxygenase-2 expression in asthmatic subjects with sputum eosinophilia. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 709-716.
- [167] Mita H, Hasegawa M, Higashi N, Akiyama K. Characterization of PGE<sub>2</sub> receptor subtypes in human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 457-459.
- [168] Ying S, O'Connor BJ, Meng Q, Woodman N, Greenaway S, Wong H, Mallett K, Lee TH, Corrigan C. Expression of prostaglandin E<sub>2</sub> receptor subtypes on cells in sputum from patients with asthma and controls: effect of allergen inhalational challenge. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 1309-1316.
- [169] Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Dolovich J, Hargreave FE. Measuring airway inflammation in asthma: eosinophils and eosinophilic cationic protein in induced sputum compared with peripheral blood. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99: 539-544.

- [170] Lemi re C, Ernst P, Olivenstein R, Yamauchi Y, Govindaraju K, Ludwig MS, Martin JG, Hamid Q. Airway inflammation assessed by invasive and noninvasive means in severe asthma: eosinophilic and noneosinophilic phenotypes. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118: 1033-1039.
- [171] Leigh R, Pizzichini MM, Morris MM, Maltais F, Hargreave FE, Pizzichini E. Stable COPD: predicting benefit from high-dose inhaled corticosteroid treatment. *Eur Respir J* 2006; 27: 964-971.
- [172] Crapo RO, Jensen RL, Hargreave FE. Airway inflammation in COPD: physiological outcome measures and induced sputum. *Eur Respir J* 2003; 21 (Suppl. 41): 19s-28s.
- [173] Jayaram L, Pizzichini MM, Cook RJ, Boulet L-P, Lemi re C, Pizzichini E, Cartier A, Hussack P, Goldsmith CH, Laviolette M, Parameswaran K, Hargreave FE. Determining asthma treatment by monitoring sputum cell counts: effect on exacerbations. *Eur Respir J* 2006; 27: 483-494.
- [174] Gibson PG, Saltos N, Fakes K. Acute anti-inflammatory effects of inhaled budesonide in asthma. A randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 32-36.
- [175] Moritz P, Steidle LJ, Felisbino MB, Kleveston T, Pizzichini MM, Pizzichini E. Determination of the inflammatory component of airway diseases by induced sputum cell counts: use in clinical practice. *J Bras Pneumol* 2008; 34 (11): 913-921.
- [176] Pizzichini MM, Pizzichini E, Clelland L, Efthimiadis A, Pavord I, Dolovich J, Hargreave FE. Prednisone-dependent asthma: inflammatory indices in induced sputum. *Eur Respir J* 1999; 13: 15-21.
- [177] Pizzichini E, Pizzichini MM, Leigh R, Djukanovic, Sterk PJ. Safety of sputum induction. *Eur Respir J* 2002; 20 (Suppl. 37): 9s-18s.
- [178] Fahy JV, Boushey HA, Lazarus SC, Mauger EA, Cherniack RM, Chinchilli VM, Craig TJ, Drazen JM, Ford JG, Fish JE, Israel E, Kraft M, Lemanske RF, Martin RJ, McLean D, Peters SP, Sorkness C, Szeffler SJ. Safety and reproducibility of sputum induction in asthmatic subjects in a multicenter study. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1470-1475.

- [179] Louis R, Bettiol J, Cataldo D, Bureau F, Seumois G, Radermecker M, Bartsch P, Djukanovic R. Intérêt des expectorations induites dans l'exploration de l'asthme. *Rev Mal Respir* 2003; 20: 215-223.
- [180] Boniface S, Koscher V, Mamessier E, El Biaze M, Dupuy P, Lorec A-M, Guillot C, Badier M, Bongrand P, Vervloet D, Magnan A. Assessment of T lymphocyte cytokine production in induced sputum from asthmatics: a flow cytometry study. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 1238-1243.
- [181] Domínguez Ortega J, León F, Martínez Alonso JC, Alonso Llamazares A, Roldán E, Robledo T, Mesa M, Bootello A, Martínez-Cócera C. Fluorocytometric analysis of induced sputum cells in an asthmatic population. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2004; 14 (2): 108-113.
- [182] Gonlugur U, Gonlugur TE. Eosinophilic bronchitis without asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; 147: 1-5.
- [183] Weller PF, Rand TH, Barrett T, Elovic A, Wong DT, Finberg RW. Accessory cell function of human eosinophils. HLA-DR-dependent, MHC-restricted antigen-presentation and IL-1 alpha expression. *J Immunol* 1993; 150 (6): 2554-2562.
- [184] Jang AS, Choi IS, Park CS. Immunohistochemically stained activated eosinophils in sputum in patients with asthma. *Respiration* 2000; 67: 183-188.
- [185] Silveira-Lemos D, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Oliveira LF, Corrêa-Oliveira R. High expression of co-stimulatory and adhesion molecules are observed on eosinophils during human *Schistosoma mansoni* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 10 (Suppl. I): 345-351.
- [186] Silveira-Lemos D, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Alves Oliveira LF, Costa-Silva MF, Matoso LF, de Souza LJ, Gazzinelli A, Corrêa-Oliveira R. Eosinophil activation status, cytokines and liver fibrosis in *Schistosoma mansoni* infected patients. *Acta Trop* 2008; 108: 150-159.
- [187] Nopp A, Lundahl J, Halldén G. Quantitative, rather than qualitative, differences in CD69 upregulation in human blood eosinophils upon activation with selected stimuli. *Allergy* 2000; 55: 148-156.

- [188] Hartnell A, Robinson DS, Kay AB, Wardlaw AJ. CD69 is expressed by human eosinophils activated in vivo in asthma and in vitro by cytokines. *Immunology* 1993; 80: 281-286.
- [189] Riedel D, Lindemann A, Brach M, Mertelsmann R, Herrmann F. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 induce surface expression of interleukin-2 receptor p55-chain and CD4 by human eosinophils. *Immunology* 1990; 70: 258-261.
- [190] Sakamoto S, Oki K, Takahashi H, Arakawa Y, Sugita H, Kawabata Y, Takeuchi K, Tomichi N. Surface antigens on eosinophils in bronchial asthma and eosinophilic pneumonia. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 108 (Suppl. 1): 6-8.
- [191] Hansel TT, Braunstein JB, Walker C, Blaser K, Bruijnzeel PLB. Sputum eosinophils from asthmatics express ICAM-1 and HLA-DR. *Clin Exp Immunol* 1991; 86: 271-277.
- [192] Duong M, Subbarao P, Adelroth E, Obminski G, Strinich T, Inman M, Pedersen S, O'Byrne PM. Sputum eosinophils and the response of exercise-induced bronchoconstriction to corticosteroid in asthma. *Chest* 2008; 133 (2): 404-411.
- [193] Belvisi MG. Regulation of inflammatory cell function by corticosteroids. *Proc Am Thorac Soc* 2004; 1: 207-214.
- [194] Beninati W, Derdak S, Dixon PF, Grider DJ, Strollo DC, Hensley RE, Lucey DR. Pulmonary eosinophils express HLA-DR in chronic eosinophilic pneumonia. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92 (3): 442-449.
- [195] Barnes PJ, Adcock IM, Ito K. Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases. *Eur Respir J* 2005; 25: 552-563.
- [196] Bhavsar P, Ahmad T, Adcock IM. The role of histone deacetylases in asthma and allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 580-584.
- [197] Ito K, Charron CE, Adcock IM. Impact of protein acetylation in inflammatory lung diseases. *Pharmacol Ther* 2007; 116: 249-265.

- [198] Hart L, Lim S, Adcock I, Barnes PJ, Chung KF. Effects of inhaled corticosteroid therapy on expression and DNA-binding activity of nuclear factor  $\kappa$ B in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 224-231.
- [199] Heijink IH, Kauffman HF, Vellenga E, Veltman-Starkenburger CA, Postma DS, de Monchy JG. Effect of ciclesonide treatment on allergen-induced changes in T cell regulation in asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; 145: 111-121.
- [200] Parsons JP, Baran CP, Phillips G, Jarjoura D, Kaeding C, Bringardner B, Wadley G, Marsh CB, Mastronarde JG. Airway inflammation in exercise-induced bronchospasm occurring in athletes without asthma. *J Asthma* 2008; 45: 363-367.
- [201] Polosa R, Ciamarra I, Mangano G, Prosperini G, Pistorio MP, Vancheri C, Crimi N. Bronchial hyperresponsiveness and airway inflammation markers in nonasthmatics with allergic rhinitis. *Eur Respir J* 2000; 15: 30-35.
- [202] Chung F. Anti-inflammatory cytokines in asthma and allergy: interleukin-10, interleukin-12, interferon- $\gamma$ . *Mediators Inflamm* 2001; 10: 51-59.
- [203] Brightling CE, Symon FA, Holgate ST, Wardlaw AJ, Pavord ID, Bradding P. Interleukin-4 and -13 expression is co-localized to mast cells within the airway smooth muscle in asthma. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 1711-1716.
- [204] Berry MA, Parker D, Neale N, Woodman L, Morgan A, Monk P, Bradding P, Wardlaw AJ, Pavord ID, Brightling CE. Sputum and bronchial submucosal IL-13 expression in asthma and eosinophilic bronchitis. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 1106-1109.
- [205] Siddiqui S, Cruse G, McKenna S, Monteiro W, Mistry V, Wardlaw A, Brightling C. IL-13 expression by blood T cells and not eosinophils is increased in asthma compared to non asthmatic eosinophilic bronchitis. *BMC Pulm Med* 2009; 9: 34-40.
- [206] De Vries JE, Yssel H. Modulation of the human IgE response. *Eur Respir J Suppl* 1996; 22: 58s-62s.



- [207] Krug N, Madden J, Redington AE, Lackie P, Djukanovic R, Schauer U, Holgate ST, Frew AJ, Howarth PH. T-cell cytokine profile evaluated at the single cell level in BAL and blood in allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 14 (4): 319-326.
- [208] Renauld JC. New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol* 2001; 54: 577-589.
- [209] De Waal Malefyt R, Abrams JS, Bennett B, Figdor C, de Vries J. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991; 174: 1209-1220.
- [210] Enk AH, Angeloni VL, Udey MC, Katz SI. Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL-10. A role for IL-10 in induction of tolerance. *J Immunol* 1993; 151: 2390-2398.
- [211] Punnonen J, de Waal Malefyt R, van Vlasselaer P, Gauchat JF, de Vries JE. IL-10 and viral IL-10 prevent IL-4-induced IgE synthesis by inhibiting the accessory cell function of monocytes. *J Immunol* 1993; 151: 1280-1289.
- [212] Cheon H, Rho YH, Choi SJ, Lee YH, Song GG, Sohn J, Won NH, Ji JD. Prostaglandin E<sub>2</sub> augments IL-10 signaling and function. *J Immunol* 2006; 177: 1092-1100.
- [213] Nakao A. Is TGF- $\beta$ 1 the key to suppression of human asthma? *Trends Immunol* 2001; 22 (3): 115-118
- [214] Alcorn JF, Rinaldi LM, Jaffe EF, van Loon M, Bates JH, Janssen-Heininger YM, Irvin CG. Transforming growth factor- $\beta$ 1 suppresses airway hyperresponsiveness in allergic airway disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176: 974-982.
- [215] Presser K, Schwinge D, Wegmann M, Huber S, Schmitt S, Quaas A, Maxeiner JH, Finotto S, Lohse AW, Blessing M, Schramm C. Coexpression of TGF- $\beta$ 1 and IL-10 enables regulatory T cells to completely suppress airway hyperreactivity. *J Immunol* 2008; 181: 7751-7758.
- [216] Chetta A, Zanini A, Foresi A, D'Ippolito R, Tipa A, Castagnaro A, Baraldo S, Neri M, Saetta M. Vascular endothelial growth factor up-regulation and bronchial wall remodelling in asthma. *Clin Exp Allergy* 2005; 35:1437-1442.

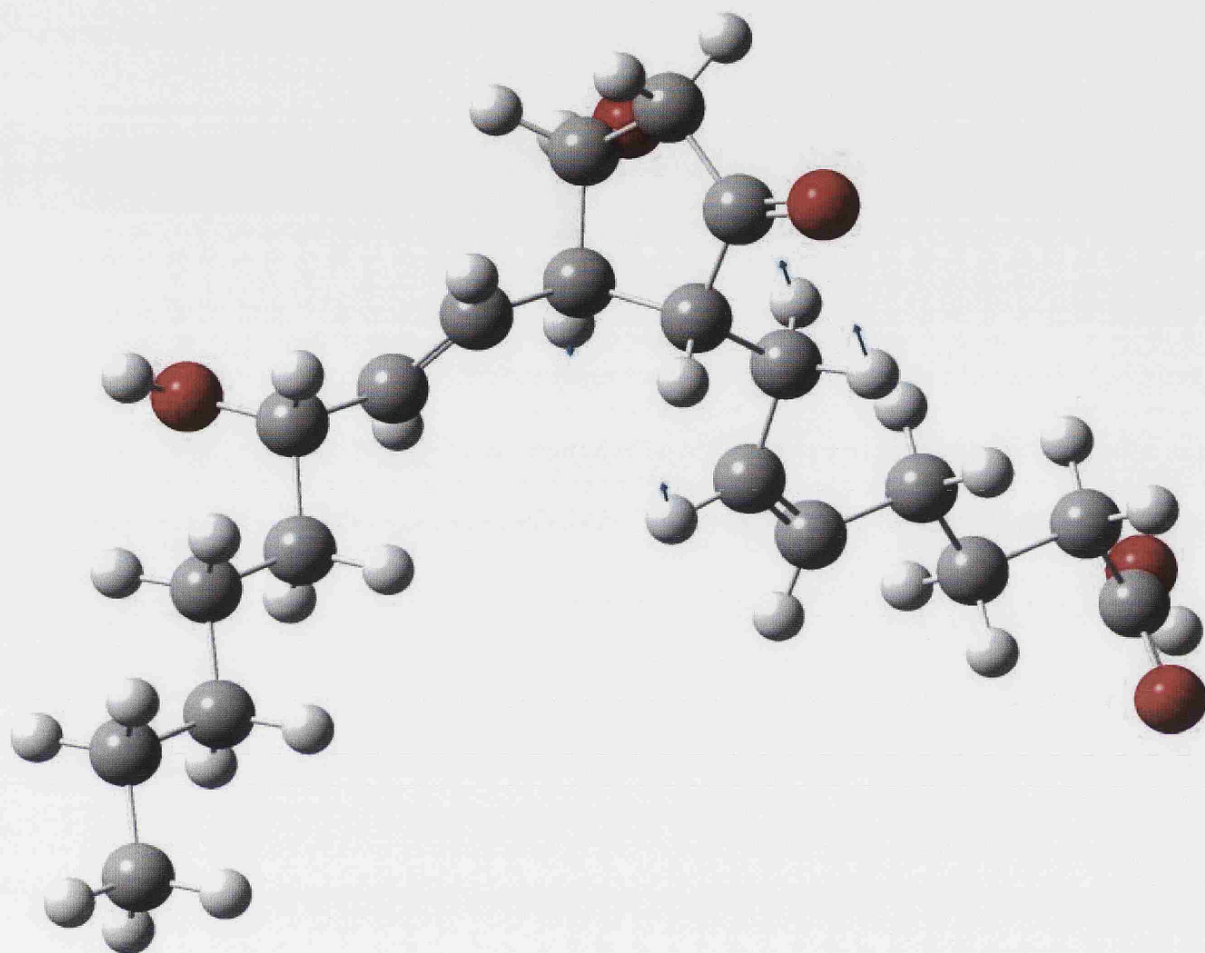
- [217] Siddiqui S, Sutcliffe A, Shikotra A, Woodman L, Doe C, McKenna S, Wardlaw A, Bradding P, Pavord I, Brightling C. Vascular remodeling is a feature of asthma and nonasthmatic eosinophilic bronchitis. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 813-819.
- [218] Kim SH, Kim DH, Lavender P, Seo JH, Kim YS, Park JS, Kwak SJ, Jee YK. Repression of TNF- $\alpha$ -induced IL-8 expression by the glucocorticoid receptor- $\beta$  involves inhibition of histone H4 acetylation. *Exp Mol Med* 2009; 41 (5): 297-306.
- [219] Matsuda A, Orihara K, Fukuda S, Fujinaga H, Matsumoto K, Saito H. Corticosteroid enhances TNF- $\alpha$ -mediated leukocyte adhesion to pulmonary microvascular endothelial cells. *Allergy* 2008; 63: 1610-1616.
- [220] Kojima F, Kato S, Kawai S. Prostaglandin E synthase in the pathophysiology of arthritis. *Fundam Clin Pharmacol* 2005; 19: 255-261.
- [221] Nagata M, Saito K. The roles of cysteinyl leukotrienes in eosinophilic inflammation of asthmatic airways. *Int Arch Allergy Immunol* 2003; 13 (Suppl.1): 7-10.
- [222] Vieira-de-Abreu A, Assis EF, Gomes GS, Castro-Faria-Neto HC, Weller PF, Bandeira-Melo C, Bozza PT. Allergic challenge-elicited lipid bodies compartmentalize in vivo leukotriene C<sub>4</sub> synthesis within eosinophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 33 (3): 254-261.
- [223] Yoshisue H, Kirkham-Brown J, Healy E, Holgate ST, Sampson AP, Davies DE. Cysteinyl leukotrienes synergize with growth factors to induce proliferation of human bronchial fibroblasts. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 132-140.
- [224] Choudry NB, Fuller RW, Pride NB. Sensitivity of the human cough reflex: effect of inflammatory mediators prostaglandin E<sub>2</sub>, bradykinin, and histamine. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140 (1): 137-141.
- [225] Stone R, Barnes PJ, Fuller RW. Contrasting effects of prostaglandin E<sub>2</sub> and F<sub>2</sub> alpha on sensitivity of the human cough reflex. *J Appl Physiol* 1992; 73 (2): 649-653.
- [226] Armour CL, Johnson PR, Alfredson ML, Black JL. Characterization of contractile prostanoid receptors on human airway smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 1989; 165 (2-3): 215-222.

- [227] Melillo E, Woolley KL, Manning PJ, Watson RM, O'Byrne PM. Effect of inhaled PGE<sub>2</sub> on exercise-induced bronchoconstriction in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149 (5): 1138-1141.
- [228] Sestini P, Armetti L, Gambaro G, Pieroni MG, Refini RM, Sasa A, Vaghi A, Folco GC, Bianco S, Robuschi M. Inhaled PGE<sub>2</sub> prevents aspirin-induced bronchoconstriction and urinary LTE<sub>4</sub> excretion in aspirin-sensitive asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153 (2): 572-575.
- [229] Picado C. COX-2 specific inhibitors in NSAID-intolerant patients. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2003; 16 (2 Suppl.): 11-16.
- [230] Hartney JM, Coggins KG, Tilley SL, Jania LA, Lovgren AK, Audoly LP, Koller BH. Prostaglandin E<sub>2</sub> protects lower airways against bronchoconstriction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 290: 105-113.
- [231] Card JW, Carey MA, Bradbury JA, Graves JP, Lih FB, Moorman MP, Morgan DL, DeGraff LM, Zhao Y, Foley JF, Zeldin DC. Cyclooxygenase-1 overexpression decreases basal airway responsiveness but not allergic inflammation. *J Immunol* 2006; 177 (7): 4785-4793.
- [232] Shimizu T, Ohto T, Kita Y. Cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>: biochemical properties and physiological roles. *Life* 2006; 58 (5-6): 328-333.
- [233] Myou S, Sano H, Fujimura M, Zhu X, Kurashima K, Kita T, Nakao S, Nonomura A, Shioya T, Kim KP, Munoz NM, Cho W, Leff AR. Blockade of eosinophil migration and airway hyperresponsiveness by cPLA<sub>2</sub>-inhibition. *Nat Immunol* 2001; 2: 145-149.
- [234] Vichai V, Suyarnsesthakorn C, Pittayakhajonwut D, Sriklung K, Kirtikara K. Positive feedback regulation of COX-2 expression by prostaglandin metabolites. *Inflamm Res* 2005; 54 (4): 163-172.
- [235] Kudo I, Murakami M. Prostaglandin E synthase, a terminal enzyme for prostaglandin E<sub>2</sub> biosynthesis. *J Biochem Mol Biol* 2005; 38 (6): 633-638.
- [236] Harizi H, Gualde N. Pivotal role of PGE<sub>2</sub> and IL-10 in the cross-regulation of dendritic cell-derived inflammatory mediators. *Cell Mol Immunol* 2006; 3 (4): 271-277.

- [237] Berg DJ, Zhang J, Lauricella DM, Moore SA. IL-10 is a central regulator of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin production. *J Immunol* 2001; 166: 2674-2680.
- [238] Shaw G, Kamen R. A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 1986; 46: 659-667.
- [239] Appleby SB, Ristimäki A, Neilson K, Narko K, HLA T. Structure of the human cyclooxygenase-2 gene. *Biochem J* 1994; 302: 723-727.
- [240] Murakami M, Kudo I. Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E<sub>2</sub>-biosynthetic pathway. *Prog Lipid Res* 2004; 43: 3-35.
- [241] Park JY, Pillinger MH, Abramson SB. Prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis and secretion: the role of PGE<sub>2</sub> synthases. *Clin Immunol* 2006; 119: 229-240.
- [242] Samet JM, Madden MC, Fonteh AN. Characterization of a secretory phospholipase A<sub>2</sub> in human bronchoalveolar lavage fluid. *Exp Lung Res* 1996; 22 (3): 299-315.
- [243] Hurley BP, McCormick BA. Multiple roles of phospholipase A<sub>2</sub> during lung infection and inflammation. *Infect Immun* 2008; 76 (6): 2259-2272.
- [244] Saiga A, Uozumi N, Ono T, Seno K, Ishimoto Y, Arita H, Shimizu T, Hanasaki K. Group X secretory phospholipase A<sub>2</sub> can induce arachidonic acid release and eicosanoid production without activation of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> alpha. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2005; 75 (1-4): 79-89.
- [245] Faour WH, He Y, He QW, de Ladurantaye M, Quintero M, Mancini A, Di Battista JA. Prostaglandin E<sub>2</sub> regulates the level and stability of cyclooxygenase-2 mRNA through activation of p38 mitogen-activated protein kinase in interleukin-1b-treated human synovial fibroblasts. *J Biol Chem* 2001; 276 (34): 31720-31731.
- [246] Shinomiya S, Naraba H, Ueno A, Utsunomiya I, Maruyama T, Ohuchida S, Ushikubi F, Yuki K, Narumiya S, Sugimoto Y, Ichikawa A, Oh-ishi S. Regulation of TNF $\alpha$  and interleukin-10 production by prostaglandins I<sub>2</sub> and E<sub>2</sub>: studies with prostaglandin receptor-deficient mice and prostaglandin E-receptor subtype-selective synthetic agonists. *Biochem Pharmacol* 2001; 61: 1153-1160.

- [247] Herrerias A, Torres R, Serra M, Marco A, Roca-Ferrer J, Picado C, de Mora F. Subcutaneous prostaglandin E<sub>2</sub> restrains airway mast cell activity in vivo and reduces lung eosinophilia and Th<sub>2</sub> cytokine overproduction in house dust mite-sensitive mice. *Int Arch Allergy Immunol* 2009; 149: 323-332.
- [248] Duncan CJ, Lawrie A, Blaylock MG, Douglas JG, Walsh GM. Reduced eosinophil apoptosis in induced sputum correlates with asthma severity. *Eur Respir J* 2003; 22: 484-490.
- [249] Krakstad C, Christensen AE, Dfskeland SO. cAMP protects neutrophils against TNF- $\alpha$ -induced apoptosis by activation of cAMP-dependent protein kinase, independently of exchange protein directly activated by cAMP (Epac). *J Leukoc Biol* 2004; 76: 641-647.
- [250] Sousa LP, Carmo AF, Rezende BM, Lopes F, Silva DM, Alessandri AL, Bonjardim CA, Rossi AG, Teixeira MM, Pinho V. Cyclic AMP enhances resolution of allergic pleurisy by promoting inflammatory cell apoptosis via inhibition of PI3K/Akt and NF-kB. *Biochem Pharmacol* 2009; 78: 396-405.
- [251] Xu Z, Choudhary S, Voznesensky O, Mehrotra M, Woodard M, Hansen M, Herschman H, Pilbeam C. Overexpression of Cox-2 in human osteosarcoma cells decreases proliferation and increases apoptosis. *Cancer Res* 2006; 66 (13): 6657-6664.
- [252] Jones CP, Paula Neto HA, Assreuy J, Vargaftig BB, Gaspar Elsas MI, Elsas PX. Prostaglandin E<sub>2</sub> and dexamethasone regulate eosinophil differentiation and survival through a nitric oxide- and CD95-dependent pathway. *Nitric Oxide* 2004; 11 (2): 184-193.
- [253] Takadera T, Shiraishi Y, Ohyashiki T. Prostaglandin E<sub>2</sub> induced caspase-dependent apoptosis possibly through activation of EP<sub>2</sub> receptors in cultured hippocampal neurons. *Neurochem Int* 2004; 45 (5): 713-719.
- [254] Liu Q, Chan ST, Mahendran R. Nitric oxide induces cyclooxygenase expression and inhibits cell growth in colon cancer cell lines. *Carcinogenesis* 2003; 24 (4): 637-642.
- [255] Kizaki H, Nakada S, Ohnishi Y, Azuma Y, Mizuno Y, Tadakuma T. Tumor necrosis factor- $\alpha$  enhances cAMP-induced programmed cell death in mouse thymocytes. *Cytokine* 1993; 5 (4): 342-347.

- [256] Ogawa Y, Duru EA, Ameredes BT. Role of IL-10 in the resolution of airway inflammation. *Curr Mol Med* 2008; 8 (5): 437-445.
- [257] Wen LP, Madani K, Fahrni JA, Duncan SR, Rosen GD. Dexamethasone inhibits lung epithelial cell apoptosis induced by IFN-gamma and Fas. *Am J Physiol* 1997; 273: L921-L929.
- [258] Hirst SJ. Regulation of airway smooth muscle cell immunomodulatory function: role in asthma. *Respir Physiol Neurobiol* 2003; 137: 309-326.
- [259] Chung KF. Airway smooth muscle cells: contributing to and regulating airway mucosal inflammation? *Eur Respir J* 2000; 15: 961-968.
- [260] Belvisi MG, Saunders M, Yacoub M, Mitchell JA. Expression of cyclo-oxygenase-2 in human airway smooth muscle is associated with profound reductions in cell growth. *Br J Pharmacol* 1998; 125: 1102-1108.
- [261] Bonazzi A, Bolla M, Buccellati C, Hernandez A, Zarini S, Viganò T, Fumagalli F, Viappiani S, Ravasi S, Zannini P, Chiesa G, Folco G, Sala A. Effect of endogenous and exogenous prostaglandin E<sub>2</sub> on interleukin-1b-induced cyclooxygenase-2 expression in human airway smooth-muscle cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 2272-2277.
- [262] Wilborn J, Crofford LJ, Burdick MD, Kunkel SL, Strieter RM, Peters-Golden M. Cultured lung fibroblasts isolated from patients with idiopathic pulmonary fibrosis have a diminished capacity to synthesize prostaglandin E<sub>2</sub> and to express cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 1995; 95: 1861-1868.
- [263] Goncharova EA, Billington CK, Irani C, Vorotnikov AV, Tkachuk VA, Penn RB, Krymskaya VP, Panettieri RA Jr. Cyclic AMP-mobilizing agents and glucocorticoids modulate human smooth muscle cell migration. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 29: 19-27.
- [264] Duffy SM, Cruse G, Cockerill SL, Brightling CE, Bradding P. Engagement of the EP<sub>2</sub> prostanoid receptor closes the K<sup>+</sup> channel K<sub>Ca3.1</sub> in human lung mast cells and attenuates their migration. *Eur J Immunol* 2008; 38: 2548-2556.



## *8. Anexo I. Abreviaturas*





<b>5-LO:</b>	5-lipooxigenasa
<b>15-PGDH:</b>	15-prostaglandina deshidrogenasa
<b>µg:</b>	Microgramo
<b>µL:</b>	Microlitro
<b>µm:</b>	Micra
<b>µM:</b>	Micromolar
<b>AA:</b>	Ácido araquidónico
<b>Ac:</b>	Anticuerpo
<b>AC:</b>	Adenilato ciclasa
<b>ADN:</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc:</b>	ADN complementario
<b>AMP:</b>	Monofosfato de adenosina
<b>AMPC:</b>	Monofosfato cíclico de adenosina
<b>Ang-II:</b>	Angiotensina-II
<b>AP-1:</b>	Proteína activadora-1
<b>Apaf-1:</b>	Factor activador-1 de la proteasa apoptótica
<b>ARN:</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNr:</b>	ARN ribosómico
<b>BC:</b>	Broncoconstricción
<b>BE:</b>	Bronquitis eosinofílica
<b>BIE:</b>	Broncoconstricción inducida por ejercicio
<b>BrdU:</b>	5-bromo-2'-deoxiuridina
<b>BSA:</b>	Albúmina de suero bovino
<b>CI:</b>	Corticosteroides inhalados
<b>CML:</b>	Células musculares lisas
<b>CMLB</b>	Células musculares lisas bronquiales
<b>COX-1:</b>	Ciclooxigenasa-1
<b>COX-2:</b>	Ciclooxigenasa-2
<b>CP:</b>	Complemento
<b>cPGES:</b>	Prostaglandina E sintasa citosólica
<b>cPLA<sub>2</sub>:</b>	Fosfolipasa A <sub>2</sub> citosólica
<b>CSIF:</b>	Factor inhibidor de la síntesis de citocinas
<b>CysLT1:</b>	Receptor 1 de Cys-LTs

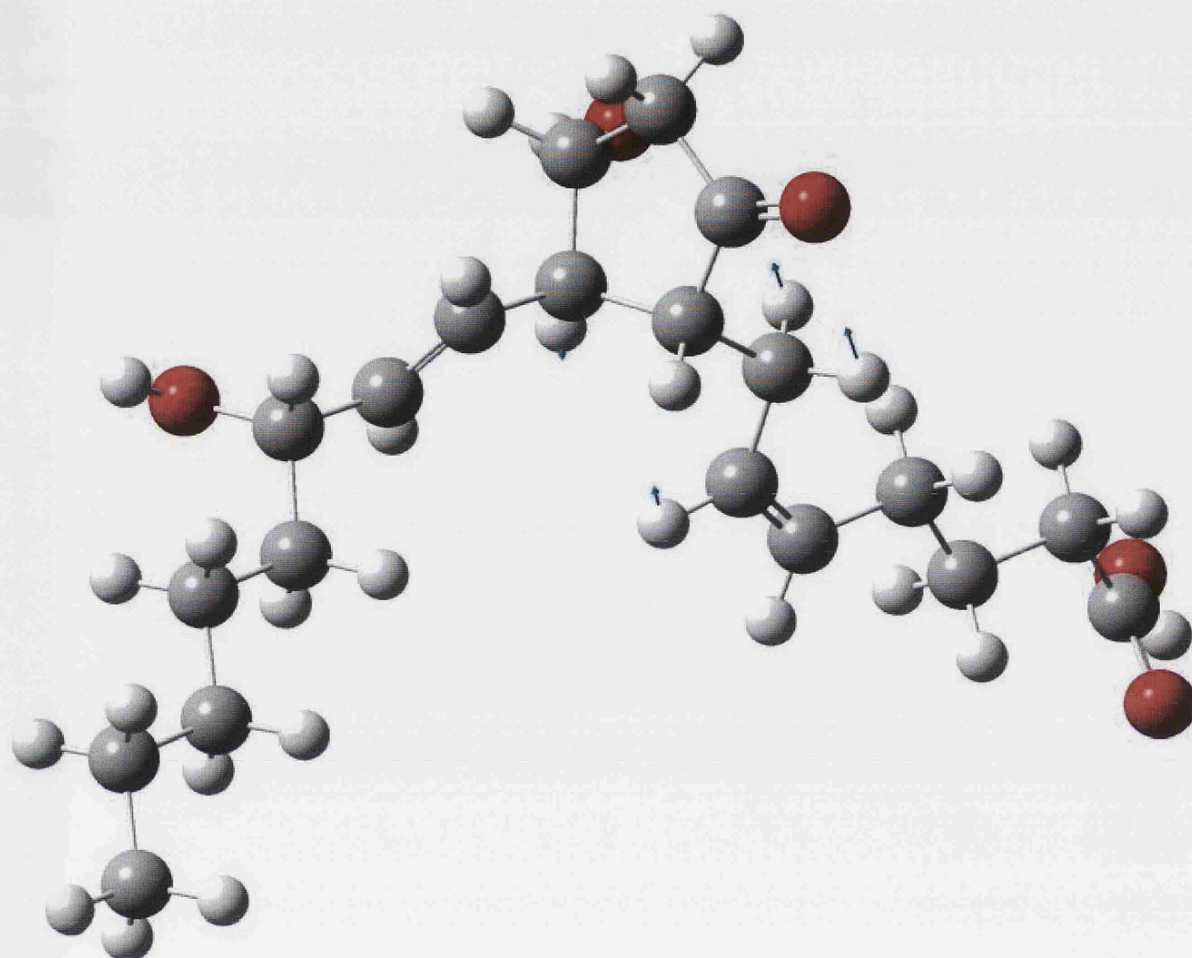
<b>CysLT2:</b>	Receptor 2 de Cys-LTs
<b>Cys-LTs:</b>	Cisteinil-leucotrienos
<b>DMSO:</b>	Dimetilsulfóxido
<b>dNTP:</b>	Dinucleótido trifosfato
<b>DTT:</b>	Ditriotreitol
<b>ECP:</b>	Proteína catiónica del eosinófilo
<b>EDN:</b>	Neurotoxina derivada del eosinófilo
<b>EDTA:</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EGF:</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>EI:</b>	Esputo inducido
<b>ELAM:</b>	Molécula 1 de adhesión leucocitaria endotelial
<b>ELISA:</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
<b>eNO:</b>	Óxido nítrico exhalado
<b>EPO:</b>	Peroxidasa del eosinófilo
<b>EPOC:</b>	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
<b>Fc:</b>	Fracción constante
<b>FEV<sub>1</sub>:</b>	Volumen espiratorio forzado en el primer segundo
<b>FGF-2:</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos-2
<b>FLAP:</b>	Proteína activadora de 5-LO unida a membrana
<b>FITC:</b>	Fluoresceína
<b>FVC:</b>	Capacidad vital forzada
<b>GM-CSF:</b>	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
<b>GPCR:</b>	Receptores acoplados a proteínas G
<b>HATs:</b>	Acetiltransferasas de histonas
<b>HDACs:</b>	Deacetilasas de histonas
<b>HB-EGF:</b>	Factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina
<b>hEGF:</b>	Factor de crecimiento endotelial humano
<b>hFGF-B:</b>	Factor B de crecimiento de fibroblastos humanos
<b>HRB:</b>	Hiperrespuesta/hiperreactividad bronquial
<b>HRP:</b>	Estreptavidina peroxidasa
<b>HRVR:</b>	Hiperrespuesta de las vías respiratorias
<b>ICAM-1:</b>	Molécula de adhesión intercelular-1

<b>IECA:</b>	Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina
<b>IFN-<math>\gamma</math>:</b>	Interferón-gamma
<b>IgE:</b>	Inmunoglobulina E
<b>IgG:</b>	Inmunoglobulina G
<b>IL ó II:</b>	Interleucina
<b>iNOS:</b>	Óxido nítrico sintasa inducible
<b>Kb</b>	Kilobase
<b>kDa:</b>	Kilodalton
<b>LBA:</b>	Lavado broncoalveolar
<b>LPS:</b>	Lipopolisacárido
<b>LTs:</b>	Leucotrienos
<b>LTA<sub>4</sub>:</b>	Leucotrieno A <sub>4</sub>
<b>LTB<sub>4</sub>:</b>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
<b>LTC<sub>4</sub>:</b>	Leucotrieno C <sub>4</sub>
<b>LTC<sub>4</sub>-S:</b>	LTC <sub>4</sub> sintasa
<b>LTD<sub>4</sub>:</b>	Leucotrieno D <sub>4</sub>
<b>LTE<sub>4</sub>:</b>	Leucotrieno E <sub>4</sub>
<b>LTRAs:</b>	Antagonistas de los receptores de leucotrienos
<b>MAPKs:</b>	Proteínas kinasas activadas por mitógeno
<b>MBP:</b>	Proteína mayor básica
<b>MCP-1,-3,-4:</b>	Proteína quimiotáctica de monocitos-1,-3,-4
<b>MHC-II:</b>	Moléculas de histocompatibilidad de clase II
<b>MIP-1<math>\alpha</math>:</b>	Proteína inflamatoria de macrófagos-1 alpha
<b>MIP-1<math>\beta</math>:</b>	Proteína inflamatoria de macrófagos-1 beta
<b>mL:</b>	Mililitro
<b>MLVA:</b>	Musculatura lisa de las vías aéreas
<b>mm:</b>	Milímetro
<b>MMPs:</b>	Metaloproteinasas
<b>mPGES-1:</b>	PGE sintasa asociada a membrana o microsomal-1
<b>mPGES-2:</b>	PGE sintasa asociada a membrana o microsomal-2
<b>nm:</b>	Nanómetro
<b>NF-<math>\kappa</math>B:</b>	Factor nuclear $\kappa$ B
<b>ng:</b>	Nanogramo

<b>NGF:</b>	Factor de crecimiento nervioso
<b>NO:</b>	Óxido nítrico
<b>NOS:</b>	Óxido nítrico sintasa
<b>OVA:</b>	Ovoalbúmina
<b>PAF:</b>	Factor de agregación plaquetaria
<b>PBMCs:</b>	Células mononucleares de sangre periférica
<b>PBS:</b>	Tampón fosfato salino
<b>PC<sub>20</sub>:</b>	Concentración necesaria de metacolina para producir una caída igual al 20% del FEV <sub>1</sub> del paciente
<b>PCR:</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PDGF:</b>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>PE:</b>	Ficoeritrina
<b>PE-Cy5:</b>	Ficoeritrina-Cy5
<b>pg:</b>	Picogramo
<b>PGs:</b>	Prostaglandinas
<b>PGD<sub>2</sub>:</b>	Prostaglandina D <sub>2</sub>
<b>PGDS:</b>	Prostaglandina D sintasa
<b>PGE:</b>	Prostaglandina E
<b>PGE<sub>2</sub>:</b>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>PGES:</b>	Prostaglandina E sintasa (normalmente referida a mPGES-1)
<b>PGF:</b>	Prostaglandina F
<b>PGF<sub>2α</sub>:</b>	Prostaglandina F <sub>2α</sub>
<b>PGFS:</b>	Prostaglandina H 9-11 endoperóxido reductasa
<b>PGG<sub>2</sub>:</b>	Prostaglandina G <sub>2</sub>
<b>PGH<sub>2</sub>:</b>	Prostaglandina H <sub>2</sub>
<b>PGI<sub>2</sub>:</b>	Prostaglandina I <sub>2</sub>
<b>PGIS:</b>	Prostaglandina I sintasa
<b>PGSs:</b>	Prostaglandina sintasas
<b>PI:</b>	Yoduro de propidio
<b>PI3K:</b>	Fosfoinositol-3-kinasa
<b>PKs:</b>	Proteínas kinasas
<b>PKA:</b>	Proteína kinasa A

<b>PKC:</b>	Proteína kinasa C
<b>PLC:</b>	Fosfolipasa C
<b>PMA:</b>	Acetato de 12-forbol, 13-miristato
<b>PS:</b>	Fosfatidil-serina
<b>qRT-PCR</b>	PCR Cuantitativa a Tiempo Real
<b>RE:</b>	Retículo endoplasmático
<b>ROS:</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>rpm:</b>	Revoluciones por minuto
<b>RT:</b>	Temperatura ambiente
<b>SCF:</b>	Factor de células madre
<b>SD:</b>	Desviación estándar
<b>SE:</b>	Error estándar de la media
<b>sPLA<sub>2</sub>:</b>	Fosfolipasa A <sub>2</sub> secretada
<b>SRS-A:</b>	Slow-reacting substance of anaphylaxis
<b>STFi:</b>	Suero de ternera fetal inactivado
<b>TAC:</b>	Complejos tetraméricos
<b>TGF-<math>\alpha</math>,<math>\beta</math>:</b>	Factor transformador del crecimiento-alpha, beta
<b>TIMPs:</b>	Tejidos inhibidores de las metaloproteinasas
<b>TMB:</b>	Tetrametilbencidina
<b>TNF-<math>\alpha</math>:</b>	Factor de necrosis tumoral-alpha
<b>TNS:</b>	Solución de neutralización de la tripsina
<b>TXA<sub>2</sub>:</b>	Tromboxano A <sub>2</sub>
<b>TXS:</b>	Tromboxano sintasa
<b>VCAM-1:</b>	Molécula de adhesión celular vascular-1
<b>VLA-4:</b>	Antígeno tardío-4
<b>VEGF:</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular





## *9. Anexo II. Publicaciones*





***PUBLICACIÓN A LA QUE HA DADO LUGAR ESTA TESIS***

**Sastre B**, Fernández-Nieto M, Mollá R, López E, Lahoz C, Sastre J, Del Pozo V, Quirce S. **Increased prostaglandin E<sub>2</sub> levels in the airway of patients with eosinophilic bronchitis.** *Allergy* 2008; 63: 58-66.

not in eosinophilic bronchitis (4). Moreover, in subjects with eosinophilic bronchitis, CXCL8 and CXCL10 concentrations were elevated in airway secretions. These chemokines may play a key role in mast cell recruitment to the superficial airway in this condition (5). Kanazawa et al. (6) found higher levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) in asthma than in eosinophilic bronchitis. The cyclooxygenase product prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) is produced by several cells in human airways, including epithelium (7) and smooth muscle (8); it has inhibitory effects on inflammatory cells and bronchoprotective effects in patients with bronchial asthma. Prostaglandin E<sub>2</sub> has been shown to protect against exercise-induced (9), allergen-induced (10), and aspirin-induced bronchoconstriction (8), as well as against bronchoconstrictor agents, such as methacholine and histamine (11). The pharmacological actions of PGE<sub>2</sub> are mediated through specific E-prostanoid (EP)-1, EP-2, EP-3, and EP-4 receptors, which are encoded by different genes and expressed differentially in each tissue (12). Prostaglandin E<sub>2</sub> may represent an endogenous protective mechanism in the airways. In this study, we postulate that the different airway function in patients with eosinophilic bronchitis and asthma could be as a result of an imbalance in the production of bronchoconstrictor (LTC<sub>4</sub>) and bronchoprotective (PGE<sub>2</sub>) lipid mediators.

## Methods

### Subjects

Thirteen subjects with nonasthmatic eosinophilic bronchitis, 13 subjects with asthma, and 11 healthy control subjects were recruited from Fundación Jiménez Díaz, Allergy clinic outpatients and staff. All patients with eosinophilic bronchitis attending our outpatient clinic during 2003 and 2006 were invited to enroll in the study, and all agreed to participate. The asthma group comprised consecutive adult patients with asthma (atopic or nonatopic) recruited in the outpatient allergy clinic. Control subjects were recruited from the staff at the allergy and immunology departments. Control subjects were lifelong nonsmokers, had no history of asthma, allergic diseases, or chronic bronchitis and they showed negative skin prick tests to common aeroallergens.

The subjects' clinical characteristics are shown in Table 1. The subjects with eosinophilic bronchitis had an isolated cough lasting more than 8 weeks, no symptoms suggesting variable airflow obstruction, normal spirometric values, a methacholine PC<sub>20</sub> value > 16 mg/ml, a normal chest radiograph, and sputum eosinophilia (sputum eosinophils > 3%). Subjects with asthma provided a consistent history and had objective evidence of asthma (as defined by the American Thoracic Society) (13) for at least 6 months. These patients showed > 12% improvement in forced expiratory volume in first second 10 min after administration of 500 µg of inhaled terbutaline, or had methacholine airway hyperresponsiveness (PC<sub>20</sub> methacholine < 16 mg/ml). Patients with asthma had mild persistent disease (14) and were clinically stable, nine were atopics and none had a history of respiratory infection for at least the 6-week period preceding the study. We included in the asthmatic group both atopic and nonatopic patients, as no differences had been previously observed in the parameters assessed between these patients.

Table 1. Clinical characteristics of study subjects

	Healthy controls	Eosinophilic bronchitis	Asthma
No.	11	13	13
Age (years)*	23 (21–42)	43 (31–71)	37 (16–61)
Male (%)	5 (45.5)	9 (69.2)	5 (38.5)
Atopy (%)	0	7 (53.8)	9 (69.2)
Duration of symptoms (years)*	0	2 (0.5–29)	8 (0.5–26)
Smoking history			
Current (%)	0	2 (15.4)	0 (0)
Ex-smoker (%)	0	4 (30.8)	2 (15.4)
Nonsmoker (%)	11 (100)	7 (53.8)	11 (84.6)
FEV <sub>1</sub> % predicted*	106 (100–130)	105 (91–128)	109 (73–127)
FEV <sub>1</sub> /FVC %*	85 (80–91)	81 (75–87)	82 (65–92)
Total serum IgE (kU/l)†	ND	48.6 (3.8–626)	135.9 (7.2–1291)
PC <sub>20</sub> methacholine (mg/ml)†	ND	NEG	2.1 (0.9–8)

FVC, forced vital capacity; FEV<sub>1</sub>, forced expiratory volume in the first second; ND, not done; NEG, (PC<sub>20</sub> > 16 mg/ml).

\*Median (range).

†Geometric mean (range).

Seven (53.8%) of the patients with eosinophilic bronchitis and nine (69.2%) of the patients with asthma were atopics (as defined by positive skin prick test to common aeroallergens). The percentage of positive skin prick tests to common aeroallergens in patients with eosinophilic bronchitis and asthma was as follows: grass and/or tree pollen (38.5% and 61.5%, respectively), house dust mites (15.4% and 30.8%), cat and/or dog dander (7.7% and 30.8%), molds (0% and 15.4%) and cockroaches (7.7% and 15.4%). Total serum immunoglobulin E (IgE) was significantly higher ( $P < 0.05$ ) in patients with asthma (geometric mean 135.9 kU/l, range 7.2–1291) than in patients with eosinophilic bronchitis (48.6 kU/l, 3.8–626 kU/l). For patients who were receiving inhaled corticosteroids (three subjects with eosinophilic bronchitis and 11 with asthma), these drugs were withdrawn for at least 2 weeks before sputum induction. No patient was receiving oral corticosteroids (for at least 6 months prior to the study), leukotriene receptor antagonists, aspirin, or any other cyclooxygenase inhibitor. Blood and sputum samples were obtained from adult donors after giving written informed consent. The study was blinded. Patients were classified with a number code by the clinical staff and all the analysis were developed in codified tubes without knowing the patient identity and diagnosis.

### Sputum induction and processing

Sputum was induced using inhalations of increasing concentrations (3%, 4%, and 5%) of hypertonic saline (15) and processed and examined for nonsquamous cell counts, as previously described (16), and following European Respiratory Society recommendations (17). Solid sputum material was selected from saliva, divided and processed within 2 h by two parallel procedures. The protocol used was previously described (18), and slightly modified. Sputum was treated with 0.1% dithiothreitol (DTT) to improve cell dispersion. Sputum was treated with a similar volume of DTT and was incubated on a shaker at 37°C for 15 min. To prevent the DTT effect on the cell suspension, an equal volume of Dulbecco's phosphate buffer saline (PBS) was added. The fraction treated with PBS + protease inhibitors (PI) was incubated at 4°C for 30 min. Mucus was then removed by means of filtration through a 100 µm-pore nylon mesh, and the filtrate was centrifuged at 400 g for 10 min to sediment any cells present. The supernatant was

aliquoted and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. Pellet was resuspended in PBS/BSA/EDTA. The total cell count, viability and squamous cells (%) were determined by trypan blue exclusion staining. Cell suspension was adjusted for  $1 \times 10^6$  cells/ml with PBS containing 2% fetal calf serum (FCS), to flow cytometry. The rest of cell suspension was resuspended in Trizol and store at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used.

#### Flow cytometry of sputum cells

For each test, 100  $\mu\text{l}$  of sputum cell suspension was incubated with 3  $\mu\text{l}$  of each monoclonal antibody (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) for 30 min at  $4^{\circ}\text{C}$  in the dark. Then, cells were washed with PBS/FCS 2% and resuspended in 400  $\mu\text{l}$  of PBS/FCS 2%. Data were acquired with a 2-laser, 5-parameter FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson) and analyzed on Cell Quest software (Becton Dickinson Bioscience). Typically, 50 000–100 000 total events were acquired to obtain adequate numbers of cellular types (10 000). All sputum cell samples were stained with Pe-Cy5 conjugated anti-human CD45 monoclonal antibody to exclude all non-leukocyte events in each test. The panel consist of: CCR3 FITC/CD16 PE, CCR3 FITC/DR PE, CD69 FITC/CD16 PE, CD14 FITC/DR PE, CD4 FITC/CD2 PE, CD4 FITC/CD25 PE, CD19 FITC/CD2 PE, CD34 FITC/CDw125 PE, CD63 FITC/IgE PE and isotype control (Becton Dickinson) that were used to establish background fluorescence for each fluorochrome.

#### Flow cytometry of whole blood

One hundred microliter of fresh whole blood was incubated with 3  $\mu\text{l}$  of each monoclonal antibody for 30 min at room temperature in the dark. Then, erythrocytes were lysed using 1 ml of FACS-lysing solution (Becton Dickinson) for 10 min and washed with 2 ml of FACS-Flow (Becton Dickinson). Finally, cells were resuspended in 500  $\mu\text{l}$  of FACS-Flow and analyzed using FACS-Calibur flow cytometer. Up to 10 000 events were analyzed per sample. The panel consist of: CCR3 FITC/CD16 PE/CD69 PeCy5, CCR3 FITC/DR PE/CD69 PeCy5, CD14 FITC/DR PE, CD4 FITC/CD2 PE/CD8 PeCy5, CD4 FITC/CD25 PE/CD8 PeCy5, CD19 FITC/CD2 PE, CD34 FITC/CDw125 PE/CD45 PeCy5, CD63 FITC/IgE PE/CD45 PeCy5 and isotype control.

#### Reverse transcription-PCR

Total RNA was isolated from sputum cells by Trizol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and was treated with DNase I (Promega, Madison, WI, USA). RNA was measured by spectrophotometry, and 1  $\mu\text{g}$  of RNA was transcribed to cDNA with first-strand cDNA synthesis with the MultiScribe transcriptase enzyme reaction (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

#### Cytokines expression in sputum cells by real-time quantitative PCR

Quantitative real-time PCR was performed on a 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems). Taqman PCR was performed using a 20  $\mu\text{l}$  final reaction volume containing 10  $\mu\text{l}$  of TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1  $\mu\text{l}$  of 20X Assays-on-Demand Gene Expression Assay Mix and 9  $\mu\text{l}$  of cDNA diluted in RNase-free water. Each assay was performed in triplicate. The PCR conditions used in all reactions were: 2 min at  $50^{\circ}\text{C}$ , 10 min at  $95^{\circ}\text{C}$ , with 40 two-step cycles ( $95^{\circ}\text{C}$  for 15 s and  $60^{\circ}\text{C}$  for 60 s). Assays-on-Demand Gene Expression primers to interleukin-5 (IL-5), IL-10, IL-13, IL-2, IL-4, VEGF, transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1), and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and rRNA 18s (used

as endogen) were obtained from Applied Biosystems (<http://www.appliedbiosystems.com/>; accessed 16 October 2007)

#### Measurement of soluble mediators, cytokines, and lipidic mediators production

We analyzed, IL-8, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and VEGF-A by ELISA Kits (Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria). The detection limit of these assays was between 0.99 and 13.5 pg/ml (5, 0.99, 3.83, and 13.5 pg/ml respectively). Coefficient of variation intra-assay was between 4% and 6.9%, and inter-assay between 5.7% and 10.9%. Moreover, we tested two types of lipidic mediators, PGE<sub>2</sub> and cysteinyl-leukotriene C4 by ELISA Kits (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA). Previously to test lipidic mediators, sputums were treated to remove protein and other contaminants that could interfere with the assay. In all patients, mediators are measured in neat supernatants in duplicate. Prostaglandin E<sub>2</sub> assay shows a detection limit of 2 pg/ml with a intra-assay coefficient of variation of 5% and a inter-assay coefficient of variation of 4% and the specificity is 100%. LTC<sub>4</sub> assay has a detection limit of 13 pg/ml, a specificity of 100% and a coefficient of variation intra- and inter-assay of 8% and 10%, respectively. We carried out several experiments to analyze a possible effect of DTT in these experiments and we observed that this compound had no effect in the measurement of lipidic mediators (data not shown). This conclusion has been supported by other authors (19, 20).

#### Data analysis

Subjects characteristics were described using descriptive statistics and expressed as median and range or geometric mean and standard deviation (SD). All measurements were performed in a blinded fashion. Comparisons of mediator concentration and sputum different cell counts across the three groups and between groups were performed using Kruskal–Wallis test and the Mann–Whitney *U*-test and ANOVA and unpaired *t* test with Welch correction for nonparametric data and parametric data, respectively. Normality was analysed with the Kolmogorov–Smirnov test. A difference was considered to be significant when  $P \leq 0.05$ . Statistical analyses were performed using GRAPHPAD INSTAT3 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

## Results

#### Differential sputum and peripheral blood cell counts

Thirty-seven sputum samples from patients with asthma, eosinophilic bronchitis and controls subjects were analysed. The sputum had <10% squamous epithelial cells and more than 85% cell viability (Table 2). No significant differences were noted between the subject groups in either total cell count or epithelial cells. Induced sputum eosinophil percentage were significantly higher in subjects with eosinophilic bronchitis and asthma than in healthy subjects (15.29%, 7.95%, and 0.95%,  $P < 0.01$ ; median) corresponding to a total count of  $1.05 \times 10^6 \pm 0.86 \times 10^6$ ,  $0.37 \times 10^6 \pm 0.36 \times 10^6$ ,  $0.05 \times 10^6 \pm 0.04 \times 10^6$  eosinophils/ml (geometric mean  $\pm$  SD). However, no significant differences were observed in the eosinophil counts between subjects with asthma and those with eosinophilic bronchitis, as shown in Table 2.

Table 2. Total and differential cell counts in induced sputum and peripheral blood (Flow Cytometry)

	Healthy controls (n = 11)	Eosinophilic bronchitis (n = 13)	Asthma (n = 13)
Induced sputum			
Total cells/ml (10 <sup>6</sup> )	3.9 (1.76–15.24)	3.96 (1.2–18.16)	2.69 (1.31–29.2)
Viable cells (%)	86.44 (74.03–92.4)	87.5 (74.41–95.2)	92.1 (78.6–96.3)†
Squamous cells (%)	8.57 (3.77–15.04)	3.67 (1.9–15.5)*	7.8 (0.34–16.4)
Macrophages (%)	15.21 (3.71–61.51)	10.94 (0.61–46.98)*	22.62 (0.2–62.61)†
Neutrophils (%)	10.22 (2.12–31.7)	27.77 (10.61–64.17)	24.72 (12.29–69.07)
Eosinophils (%)	0.95 (0.09–1.91)	15.29 (1.98–64.03)*	7.95 (3.06–30.94)*
Lymphocytes (%)	1.49 (0.21–3.29)	0.77 (0.01–3.55)*	0.7 (0.03–5.89)*
Eosinophilic precursors	0.04 (0–0.19)	0.01 (0–7.48)	0.03 (0–0.89)
Activated basophils	0.32 (0.13–2.4)	0.52 (0–26.5)	0.44 (0–5.96)
Activated eosinophils CD69 <sup>+</sup>	0.39 (0.03–2.14)	1.51 (0.12–44.39)*	1.31 (0.19–8.6)*
Activated eosinophils CD25 <sup>+</sup>	0.29 (0.01–2.51)	2.74 (0.19–7.1)†	1.49 (0.37–5.55)*
Peripheral blood			
Monocytes (%)	2.2 (1.27–3.38)	3.49 (1–8.2)	4.24 (2.02–6.11)
Neutrophils (%)	37.18 (13.34–50.57)	40.51 (22.46–59.65)†	49.59 (14.78–67.66)
Eosinophils (%)	0.04 (0–0.9)	4.46 (1.21–10.22)*‡	1.66 (0.57–6.48)*
Lymphocytes (%)	9.52 (0–64–20.39)	15.94 (6.31–26.4)	17.91 (10.89–30.3)
Purified eosinophils/mm <sup>3</sup> (10 <sup>6</sup> )	2.79 (1.6–16)	22.4 (1.12–36.26)*	22.2 (3.96–52)*

Results are expressed as median (range).

\* $P < 0.01$  compared with healthy control subjects.

† $P < 0.05$  compared with healthy control subjects.

‡ $P < 0.01$  compared with asthmatic subjects.

The percentage of activated eosinophils (CD25<sup>+</sup> and CD69<sup>+</sup>) in sputum was significantly higher in the eosinophilic bronchitis and asthma groups than in the healthy control group, but was similar in the former two groups. No differences were seen in other differential cell counts in induced sputum between the groups, except in macrophage and lymphocytes counts, which were significantly lower in subjects with eosinophilic bronchitis and asthma than in control subjects. Median percentage of eosinophils on peripheral blood was significantly higher in the subjects with eosinophilic bronchitis and asthma than in healthy control subjects (4.46, 1.66 and 0.04 respectively;  $P < 0.0001$ ).

Quantitative expression of cytokines genes in induced sputum cells from eosinophilic bronchitis, asthmatic patients and healthy controls.

We assessed different cytokine levels as IL-5, IL-10, IL-13, IL-4, and IL-2 and IFN- $\gamma$ , representatives of T helper 2 (Th2) and Th1 cytokines. Moreover, we measured levels of VEGF and TGF- $\beta$ 1. The results indicated that IL-5, IL-4, IL-10, IL-13, IL-2, and IFN- $\gamma$  levels were similar in subjects with asthma or eosinophilic bronchitis (Fig. 1). Interleukin-5 and IL-13 expression increased in the subjects with eosinophilic bronchitis as compared with that seen in healthy controls ( $P < 0.05$ , Fig. 2A,  $P < 0.01$  Fig. 1D). In asthmatic and eosinophilic bronchitis patients no significant differences were observed in the IL-4, IL-10, IL-2 and IFN- $\gamma$  expression as compared with the healthy control group. There were not significant changes in the levels of VEGF and TGF- $\beta$  between both groups with disease and the control group

(Fig. 1G,H). Thus, analysis of expression of several cytokines in the study groups showed that IL-5 and IL-13 are the predominant mediators in the local inflammatory process in the airways, with a Th2 cytokine profile in both diseases.

#### Cytokines levels in induced sputum supernatant

Production of several cytokines by sputum cells was evaluated. Interferon- $\gamma$  and IL-8 concentrations were significantly increased in induced sputum samples from patients with respiratory disease (asthma and eosinophilic bronchitis) as compared with the control subjects (Fig. 2A,B). There was no significant difference of sputum TNF- $\alpha$  level between groups (Fig. 2C).

#### Lipidic mediators in induced sputum supernatant

An inverse relationship was observed between PGE<sub>2</sub> and LTC<sub>4</sub> concentrations in patients with asthma and eosinophilic bronchitis. Whereas LTC<sub>4</sub> levels were more elevated in the asthmatic group, eosinophilic bronchitis patients had increased PGE<sub>2</sub> levels. In eosinophilic bronchitis patients we observed significantly increased level of PGE<sub>2</sub> as compared with healthy and asthmatic patients;  $P < 0.005$  and  $P < 0.05$ , respectively (Fig. 3A), whereas the latter two groups had similar values. By contrast, LTC<sub>4</sub> was significantly higher in the asthmatic group with respect to the others, with  $P < 0.05$  between control and asthmatic subjects (Fig. 3B). Moreover, the ratio of LTC<sub>4</sub> to PGE<sub>2</sub> in induced sputum was significantly higher in asthmatics than in patients with eosinophilic bronchitis  $P < 0.005$  (Fig. 4).

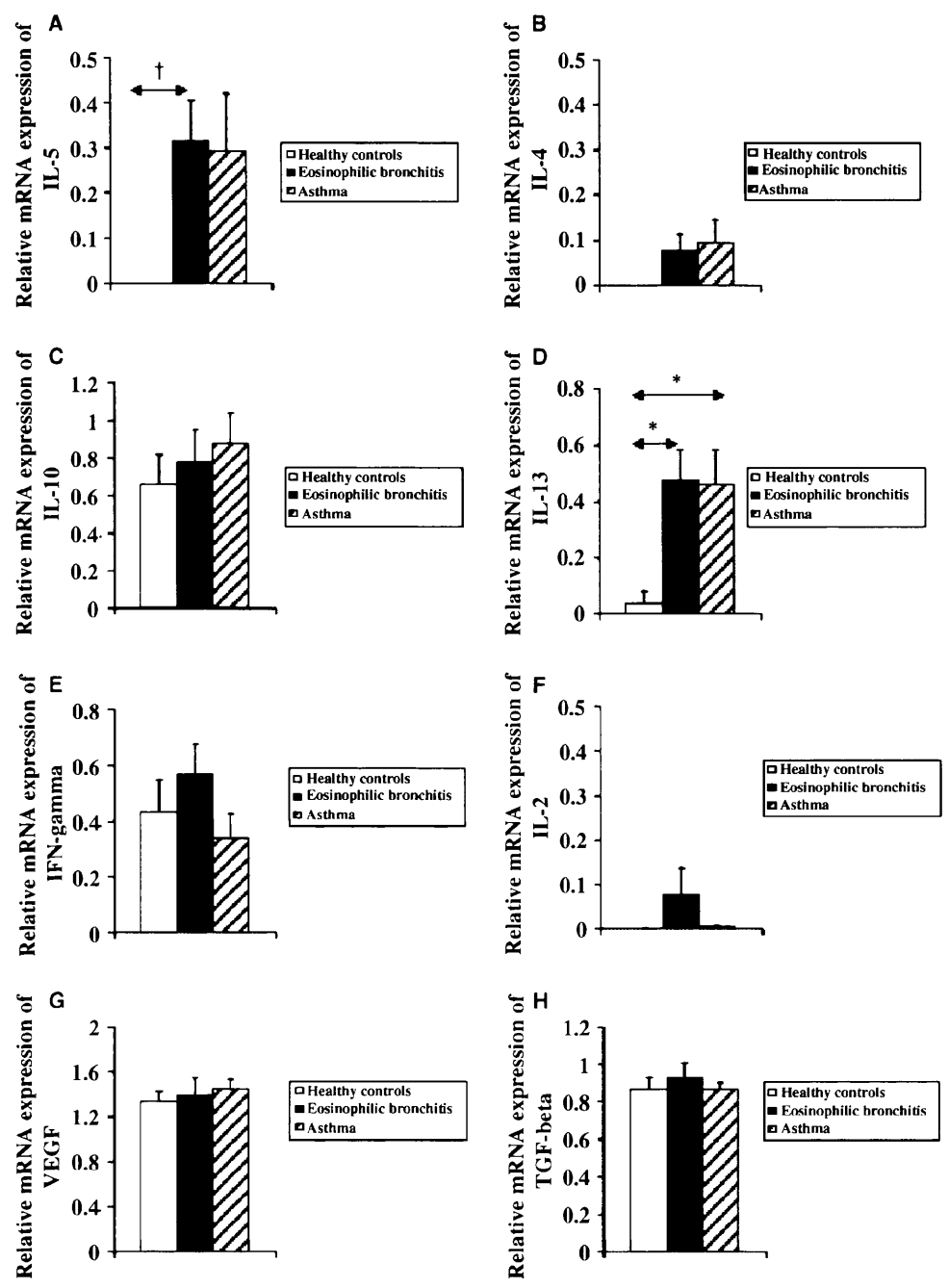


Figure 1. Cytokine mRNA expression in induced sputum from healthy subjects, asthmatic, and eosinophilic bronchitis patients. Relative mRNA levels of IL-5 (A), IL-4 (B), IL-10 (C), IL-13 (D), IFN- $\gamma$  (E), IL-2 (F), VEGF (G), and TGF- $\beta$  (H) gene expression in sputum cells from different groups of subjects were determined by real-time quantitative PCR. Cytokine levels were expressed as relative mRNA expression. Values were normalized with rRNA gene use as endogen. Significant differences in IL-5 ( $\dagger P < 0.05$ ) and IL-13 ( $*P < 0.01$ ) expression levels were obtained for eosinophilic bronchitis vs healthy controls. In the rest of cytokines studied, no significant differences were found between groups.

Discussion

Our results shows that induced sputum PGE<sub>2</sub> concentrations are strikingly increased (100-fold higher) in subjects with eosinophilic bronchitis as compared with asthmatic

and healthy subjects. Sputum cysteinyl-leukotrienes concentration was raised both in eosinophilic bronchitis and asthma patients. These data suggest that the differences in airway function observed in subjects with eosinophilic bronchitis and asthma might be due to differences in

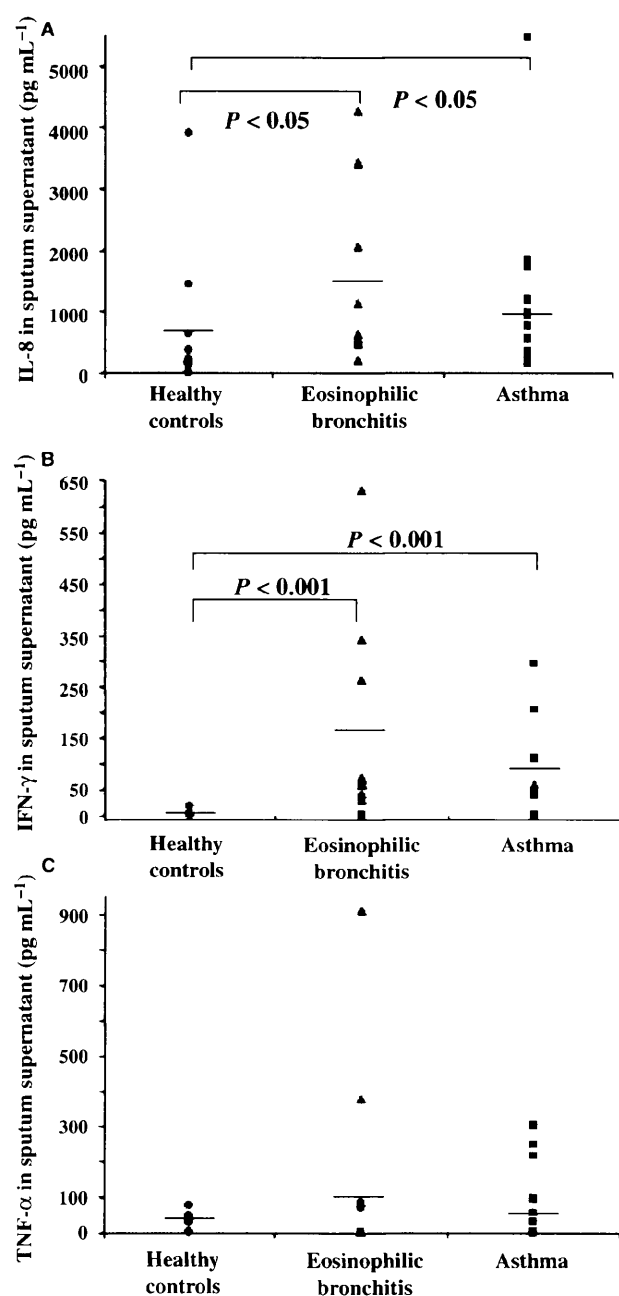


Figure 2. Cytokine levels in induced sputum supernatants. A comparison of (A) IL-8, (B) IFN- $\gamma$ , and (C) TNF- $\alpha$  levels in induced sputum supernatants from healthy controls, eosinophilic bronchitis and subjects with asthma. Sputum from asthmatics and eosinophilic bronchitis had significant higher levels of IL-8, and IFN- $\gamma$  than healthy subjects.

PGE<sub>2</sub> production. We have also measured a wide array of cytokines and autacoids with different functions, representing the major regulator, effector and airway damaging mediators in asthma, and we did not observe significant differences in the majority of them between both disorders.

We have detected that eosinophilic bronchitis is a disease characterized by an increased expression of Th2 cytokines (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13), as previously shown by other authors (21). These data point out a dissociation between T-cell activation and the abnormalities in airway physiology that characterize asthma (22). These results suggest that Th2-mediated cytokines are closely linked to eosinophilic inflammation, but they are not necessarily associated with the physiologic hallmarks of the asthmatic phenotype. In our study, there were no significant differences in the eosinophil counts in patients with asthma and those with eosinophilic bronchitis, and we did not find either any significant differences in activated eosinophils, eosinophil precursors and activated basophils between patients with eosinophilic bronchitis and asthma.

Recently, the involvement of VEGF in the pathogenesis of asthma has generated an active discussion. We measured this factor by two methods: quantitative real-time PCR and determination of soluble VEGF in supernatant (data not shown). We found a moderate increase of VEGF in sputum supernatant in eosinophilic bronchitis patients, whereas asthmatic patients showed similar values to healthy controls, the differences not being statistically significant. An increase in VEGF levels in the airways of asthmatic subjects as compared with control subjects or eosinophilic bronchitis patients (6) has been previously reported, but this finding was not observed in our study. Demoly et al. (23), however, reported a similar concentration of VEGF in the bronchoalveolar lavage from patients with asthma and normal controls. Thus, the role of VEGF in the pathogenesis of asthma remains unclear (24).

Cysteinyl-leukotrienes produced by eosinophils and mast cells are potent airway smooth-muscle contractile agonists, increase mucus production and vascular permeability, and may directly increase eosinophilic inflammation (25). Prostaglandin E<sub>2</sub> increase cough sensitivity by a direct effect on cough receptors (26). We chose induced sputum supernatant to assess airway mediator production as this method is noninvasive, simple, safe, and responsive (19). Previous studies have shown that sputum mediator concentrations are significantly higher than in bronchoalveolar lavage and can be measured repeatedly (16, 19). Cell viability was not different between groups, indicating that the observed differences in mediator levels were probably not because of cytotoxic release. Furthermore, leukotrienes and prostanoids are not stored preformed.

This study illustrates that, like asthma, there is active airway inflammation in eosinophilic bronchitis, with release of different inflammatory mediators. The main significant difference between asthma and eosinophilic bronchitis was the different ratio in the production of bronchoconstrictor (LTC<sub>4</sub>) and bronchoprotective (PGE<sub>2</sub>) lipid mediators. In asthma, there may be a reduction in bronchoprotective substances such as PGE<sub>2</sub> (27). We found much lower PGE<sub>2</sub> concentrations in

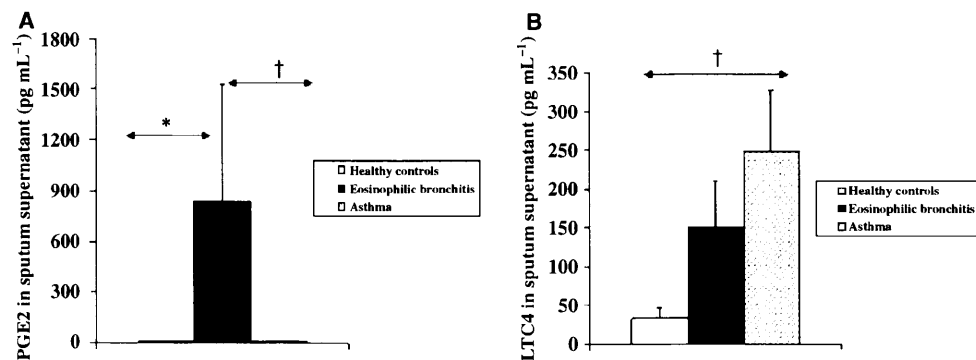


Figure 3. Sputum eicosanoids concentration in healthy controls, eosinophilic bronchitis and asthmatics. PGE<sub>2</sub> concentrations (A) and LTC<sub>4</sub> concentrations (B) in induced sputum samples were analysed by specific ELISA kits, as described in the methods section. Data are expressed as geometric mean  $\pm$  SD. Subjects with eosinophilic bronchitis had significantly higher PGE<sub>2</sub> concentrations as compared with healthy controls and asthmatics (\* $P < 0.01$ ; † $P < 0.05$  respectively). Statistical analysis was performed by Mann-Whitney *U*-test.

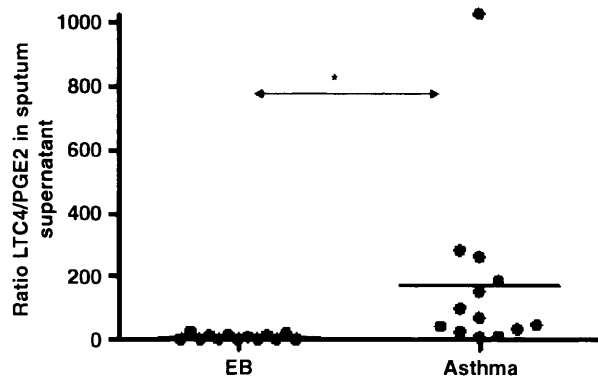


Figure 4. Ratio LTC<sub>4</sub>/PGE<sub>2</sub> in induced sputum in eosinophilic bronchitis and asthmatics. Individual data and geometric mean from asthmatic and eosinophilic bronchitis subjects. Patients with asthma had a significantly higher LTC<sub>4</sub>/PGE<sub>2</sub> ratio than patients with eosinophilic bronchitis (\* $P < 0.01$ ).

patients with asthma than in eosinophilic bronchitis, supporting this hypothesis. We did not find any correlation between sputum eosinophil counts and PGE<sub>2</sub> levels in sputum supernatant. In contrast, other authors have found disparate results, reporting a negative or positive correlation between PGE<sub>2</sub> concentrations and sputum eosinophils (19, 28). As macrophages are a potential source of PGE<sub>2</sub> (29), we considered whether the low PGE<sub>2</sub> level in the sputum supernatants of asthmatic patients may be caused by reduced number of macrophages, but macrophage counts in eosinophilic bronchitis and asthmatic patients were similar.

Brightling et al. (30) also found numerically higher levels of PGE<sub>2</sub> in sputum from patients with eosinophilic bronchitis, but the differences were not statistically significant as compared with asthma patients. The discrepancy observed between this study and our results might be due to the different technique employed to

measure PGE<sub>2</sub>, or to the different number of patients with eosinophilic bronchitis examined. Recently, elevated sputum PGE<sub>2</sub> concentrations have been found in all patients with chronic cough (31), although in this study cough variant asthma and eosinophilic bronchitis patients were included in the same group. One possible explanation can be that PGE<sub>2</sub> concentrations are elevated because of the mechanical effect of coughing *per se*, or it is possible that release of this mediator is related to the enhanced cough reflex sensitivity seen in subjects with chronic cough, because inhaled PGE<sub>2</sub> results in heightened cough reflex sensitivity to capsaicin (26).

The differences in sputum supernatant PGE<sub>2</sub> concentration between asthmatic and eosinophilic bronchitis patients may be the result of a different degradation kinetic or activity of enzymes implicated in the synthesis and/or degradation of products of arachidonic acid metabolism. It has been recently shown that Th2 cytokines have specific effects on PGE synthase 1 and 15-PGDH enzymes in airway human epithelial cells (32). Differences in these PGE<sub>2</sub>-related pathways between patients with asthma and eosinophilic bronchitis deserve further research.

We postulate that PGE<sub>2</sub> elevation in patients with eosinophilic bronchitis may have protective effects against the development of bronchial hyperresponsiveness. The fact that PGE<sub>2</sub> and its analog have a number of bronchoprotective and anti-inflammatory effects *in vitro* (27) or after inhalation (10), as well as on allergen-induced airway responses and airway inflammation in atopic asthma (19, 33) would support such protective role. An imbalance in the ratio of bronchoconstrictor (LTC<sub>4</sub>) and bronchoprotective (PGE<sub>2</sub>) lipid mediators may have a role in the pathogenesis of eosinophilic bronchitis. Prostaglandin E<sub>2</sub> can perform contrasting activities, which can thus lead to bronchodilation and may act as an anti-inflammatory or pro-inflammatory mediator in the lung (34). Recently, several studies

showed that the PGE<sub>2</sub> protective actions were mediated in large part by the EP<sub>2</sub> receptors (35, 36). This protective action of PGE<sub>2</sub> might not only result in a direct effect on airway smooth-muscle relaxation, but also in the inhibition on many inflammatory processes (37).

This data can explain why patients with eosinophilic have normal tests of variable airway obstruction and airway responsiveness and experience chronic cough due to high PGE<sub>2</sub> levels because of its adverse effects of cough reflex and retrosternal burning (38). The pathogenesis of eosinophilic bronchitis might be the opposite to that observed in aspirin-induced asthma. There is increasing evidence that, by inhibiting cyclooxygenase-1, the protective effect exerted by endogenous PGE<sub>2</sub> on leukotriene generation by mast cells, eosinophils and macrophages in the airways is removed in the latter condition. In these patients with aspirin-induced bronchoconstriction, a low production of PGE<sub>2</sub> has been observed, seemingly because of deficient COX-2 regulation and increase expression of leukotriene-C4 synthase (39).

In conclusion, we have shown that PGE<sub>2</sub> is present in significantly higher concentrations in subjects with eosinophilic bronchitis than in asthmatic and control subjects. We suggest that this elevation in PGE<sub>2</sub> could explain the different physiological features observed in eosinophilic bronchitis and asthma, because of the protective effect of PGE<sub>2</sub> in airway tone and responsiveness. The findings in this study have potential implications to our understanding of the pathogenesis of eosinophilic bronchitis, although further studies are required to determine whether other mediators are involved and to determine the mechanism(s) associated with the beneficial role of PGE<sub>2</sub> in airway responsiveness.

# Acknowledgment

This study was supported by Foundation SEAIC (Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica); and fellowship grants from the Conchita Rábago Foundation (R.M) and the FIS (B.S).

# References

- Gibson PG, Dolovich J, Denburg J, Ramsdale EH, Hargreave FE. Chronic cough: eosinophilic bronchitis without asthma. *Lancet* 1989;1:1346–1348.
- Brightling CE, Ward R, Goh KL, Wardlaw AJ, Pavord ID. Eosinophilic bronchitis is an important cause of chronic cough. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:406–410.
- Gibson PG, Zlatich K, Scott J, Sewell W, Woolley K, Salto N. Chronic cough resembles asthma with IL-5 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene expression in bronchoalveolar cells. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:320–326.
- Brightling CE, Pavord ID. Location, location, location: microlocalisation of inflammatory cells and airway dysfunction. *Thorax* 2004;59:734–735.
- Woodman L, Sutcliffe A, Kaur D, Berry M, Bradding P, Pavord ID et al. Chemokine concentrations and mast cell chemotactic activity in BAL fluid in patients with eosinophilic bronchitis and asthma, and in normal control subjects. *Chest* 2000;130:371–378.
- Kanazawa H, Nomura S, Yoshikawa J. Role of microvascular permeability on physiologic differences in asthma and eosinophilic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:1125–1130.
- Churchill L, Chilton FH, Resau JH, Bascom R, Hubbard WC, Proud D. Cyclo-oxygenase metabolism of endogenous arachidonic acid by cultured human tracheal epithelial cells. *Am Rev Respir Dis* 1989;140:449–459.
- Delamere F, Holland E, Patel S, Pavord I, Knox A. Production of PGE<sub>2</sub> by bovine cultured airway smooth muscle cells and its inhibition by cyclo-oxygenase inhibitors. *Br J Pharmacol* 1994;111:983–988.
- Melillo E, Woolley KL, Manning PJ, Watson RM, O'Byrne PM. Effect of inhaled PGE<sub>2</sub> on exercise-induced bronchoconstriction in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:1138–1141.
- Pavord ID, Wong CS, Williams J, Tattersfield AE. Effect of inhaled prostaglandin E<sub>2</sub> on allergen-induced asthma. *Am Rev Respir Dis* 1993;148:87–90.
- Manning PJ, Lane CG, O'Byrne PM. The effect of oral prostaglandin E<sub>1</sub> on airway responsiveness in asthmatic subjects. *Pulm Pharmacol* 1989;2:121–124.
- Kobayashi T, Narumiya S. Function of prostanoid receptors: studies on knockout mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002;69:557–573.
- American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:225–244.
- Global strategy for asthma management and prevention. Update from NHLB/WHO Workshop Report 1995. GINA, Revised 2002, NIH Publication No. 02-3659, 2002.
- Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg JA, Hargreave FE et al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 1992;47:25–29.
- Pizzichini E, Pizzichini MMM, Efthimiadis A, Evans S, Morris MM, Squillace D et al. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:308–317.
- Efthimiadis A, Spanevello A, Hamid Q, Kelly MM, Linden M, Louis R et al. Methods of sputum processing for cell counts, immunocytochemistry and *in situ* hybridisation. *Eur Respir J* 2002;20(Suppl. 37):19s–23s.
- Hadjicharalambous C, Dent G, May RD, Handy RL, Anderson IK, Davies DER et al. Measurement of eotaxin (CCL11) in induced sputum supernatants: validation and detection in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:657–662.
- Pavord ID, Ward R, Woltmann G, Wardlaw AJ, Sheller JR, Dworski R. Induced sputum eicosanoid concentrations in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:905–909.



20. MacFarlane AJ, Dworski R, Sheller JR, Pavord ID, Barry Kay A, Barnes NC. Sputum cysteinyl leukotrienes increase 24 h after allergen inhalation in atopic asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;**161**:1553–1558.
21. Brightling CE, Symon FA, Birring SS, Bradding P, Pavord ID, Wardlaw AJ. TH2 cytokine expression in bronchoalveolar lavage fluid T lymphocytes and bronchial submucosa is a feature of asthma and eosinophilic bronchitis. *J Allergy Clin Immunol* 2002;**110**:899–905.
22. Brightling CE, Symon FA, Birring SS, Bradding P, Wardlaw AJ, Pavord ID. Comparison of airway immunopathology of eosinophilic bronchitis and asthma. *Thorax* 2003;**58**:528–5323.
23. Demoly P, Maly FE, Mautino G, Grad S, Gougat C, Sahla H et al. VEGF levels in asthmatic airways do not correlate with plasma extravasation. *Clin Exp Allergy* 1999;**29**:1390–1394.
24. Thomson NC, Chaudhuri R. Why is eosinophilic bronchitis not asthma? *Am J Respir Crit Care Med* 2004;**170**:4–5.
25. Laitinen LA, Laitinen A, Haahtela T, Vilkkä V, Spur BW, Lee TH. Leukotriene E<sub>4</sub> and granulocytic infiltration into asthmatic airways. *Lancet* 1993;**341**:989–990.
26. Choudry NB, Fuller RW, Pride NB. Sensitivity of the human cough reflex: effect of inflammatory mediators prostaglandin E<sub>2</sub>, bradykinin, and histamine. *Am Rev Respir Dis* 1989;**140**:137–141.
27. Pavord ID, Tattersfield AE. Broncho-protective role for endogenous prostaglandin E<sub>2</sub>. *Lancet* 1995;**345**:436–438.
28. Profita M, Sala A, Bonanno A, Riccobono L, Siena L, Melis MR et al. Increased prostaglandin E<sub>2</sub> concentrations and cyclooxygenase-2 expression in asthmatics subjects with sputum eosinophilia. *J Allergy Clin Immunol* 2003;**112**:709–716.
29. Holtzman MJ. Arachidonic acid metabolism. Implications of biological chemistry for lung function and disease. *Am Rev Respir Dis* 1991;**143**:188–203.
30. Brightling CE, Ward R, Woltmann G, Bradding P, Sheller JR, Dworski R et al. Induced sputum inflammatory mediator concentrations in eosinophilic bronchitis and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;**162**:878–882.
31. Birring SS, Parker D, Brightling CE, Bradding P, Wardlaw AJ, Pavord ID. Induced sputum inflammatory mediator concentrations in chronic cough. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;**169**:15–19.
32. Trudeau J, Hu H, Chibana K, Chu HW, Westcott JY, Wenzel SE. Selective downregulation of prostaglandin E<sub>2</sub>-related pathways by the Th2 cytokine IL-13. *J Allergy Clin Immunol* 2006;**117**:1446–1454.
33. Gauvreau GM, Watson RM, ÓByrne PM. Protective effects of inhaled PGE<sub>2</sub> on allergen-induced airway responses and airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;**159**:31–36.
34. Vancheri C, Mastruzzo C, Sortino MA, Crimi N. The lung as a privileged site for the beneficial actions of PGE<sub>2</sub>. *Trends Immunol* 2004;**25**:40–46.
35. Feng C, Beller EM, Bagga S, Boyce JA. Human mast cells express multiple EP receptors for prostaglandin E<sub>2</sub> that differentially modulate activation responses. *Blood* 2006;**107**:3243–3250.
36. Hartney JM, Coggins KG, Tilley SL, Jania LA, Lovgren AK, Audoly LP et al. Prostaglandin E<sub>2</sub> protects lower airways against bronchoconstriction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;**290**:L105–L113.
37. Tanaka H, Kanako S, Abe S. Prostaglandin E<sub>2</sub> receptor selective agonists E-prostanoid 2 and E-prostanoid 4 may have therapeutic effects on ovalbumin-induced bronchoconstriction. *Chest* 2005;**128**:3717–3723.
38. Coleridge HM, Coleridge JCG, Ginzel KH, Baker DG, Banzett RB, Morrison MA. Stimulation of “irritant” receptors and afferent C-fibres in the lungs by prostaglandins. *Nature* 1976;**264**:451–453.
39. Picado C. Aspirin-intolerant asthma: role of cyclo-oxygenase enzymes. *Allergy* 2002;**57**:58–60.



### ***PUBLICACIONES VINCULADAS A ESTA TESIS POR METODOLOGÍA***

- Fernández-Nieto M, Quirce S, Fraj J, Del Pozo V, Seoane C, Sastre B, Lahoz C, Sastre J. **Airway inflammation in occupational asthma caused by styrene.** *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117(4): 948-50.
  
- Madero MF, Enríquez-Matas A, Fernández-Nieto M, Sastre B, Del Pozo V, Pastor C, Quirce S, Sastre J. **Characterization of allergens from the fish bait *Galleria mellonella*.** *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119 (4): 1021-1022.
  
- Quirce S, Fernández-Nieto M, del Pozo V, Sastre B, Sastre J. **Occupational asthma and rhinitis caused by eugenol in a hairdresser.** *Allergy* 2008; 63(1): 137-138.
  
- Quirce S, Fernández-Nieto M, Pastor C, Sastre B, Sastre J. **Occupational asthma due to tampico fiber from agave leaves.** *Allergy* 2008; 63(7): 943-5.
  
- Barranco P, Fernández-Nieto M, del Pozo V, Sastre B, Larco JI, Quirce S. **Nonasthmatic eosinophilic bronchitis in a baker caused by fungal alpha-amylase and wheat flour.** *J Investig Allergol Clin Immunol* 2008; 18(6): 494-5.
  
- Fernández-Nieto M, Sastre B, Sastre J, Lahoz C, Quirce S, Madero M, del Pozo V. **Changes in sputum eicosanoids and inflammatory markers after inhalation challenges with occupational agents.** *Chest* 2009; 136: 1308-1315.



Giovanni Passalacqua, MD<sup>a</sup>  
 Antonino Musarra, MD<sup>b</sup>  
 Silvia Pecora, MD<sup>c</sup>  
 Saverio Amoroso, MD<sup>d</sup>  
 Leonardo Antonicelli, MD<sup>e</sup>  
 Gianni Cadario, MD<sup>f</sup>  
 Mario Di Gioacchino, MD<sup>g</sup>  
 Carlo Lombardi, MD<sup>h</sup>  
 Erminia Ridolo, MD<sup>i</sup>  
 Guido Sacerdoti, MD<sup>j</sup>  
 Domenico Schiavino, MD<sup>k</sup>  
 Gianenrico Senna, MD<sup>l</sup>

From the <sup>a</sup>Allergy and Respiratory Diseases, Department of Internal Medicine, University of Genoa, Pad Maragliano, L.go R Benzi 10, 16132 Genoa, Italy; <sup>b</sup>Allergy Unit, National Healthcare System, Reggio Calabria; <sup>c</sup>ALK-Abelló Italy, Lainate, Milan; <sup>d</sup>Civic Hospital of Palermo; <sup>e</sup>Allergy Unit, Azienda Ospedaliera-Universitaria Ospedali Riuniti, Ancona; <sup>f</sup>Division of Allergy and Clinical Immunology, S. Giovanni Battista Hospital, Turin; <sup>g</sup>Allergy Unit, Policlinico Colledara, Chieti; <sup>h</sup>Pneumoallergology Unit, FBF S. Osola, Brescia; <sup>i</sup>Department of Clinical Sciences, University of Parma; <sup>j</sup>Policlinico Federico II, Naples; <sup>k</sup>Allergy Unit, Policlinico Gemelli, Rome; <sup>l</sup>Allergy Unit, Verona General Hospital, Verona, Italy.

Disclosure of potential conflict of interest: S. Pecora is employed by ALK-Abelló. The rest of the authors have no conflict of interest to disclose.

## REFERENCES

- World Health Organization position paper: allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. Bousquet J, Lockey R, Malling HJ, editors. *Allergy* 1998;53(suppl):1-33.
- Allergic rhinitis and its impact on asthma. Bousquet J, Van Cauwenberge P, editors. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108(suppl 5):S146-50.
- Lombardi C, Gargioni S, Melchiorre A, Tiri A, Falagiani P, Canonica GW, et al. Safety of sublingual immunotherapy in adults: a post marketing surveillance study. *Allergy* 2001;56:889-92.
- Di Rienzo V, Musarra A, Sambugaro R, Minelli M, Pecora S, Canonica GW, et al. Post marketing survey on the safety of sublingual immunotherapy in children below the age of 5 years. *Clin Exp Allergy* 2005;35:560-4.
- Haynes RB. Introduction. In: Haynes RB, Taylor DW, Sackett L, editors. *Compliance in healthcare*. Baltimore: John Hopkins University Press; 1979.
- Osterberg L, Blaschke T. Adherence to medication. *N Engl J Med* 2005;353:487-97.
- Tinkelman D, Smith F, Cole WQ 3rd, Slik HJ. Compliance with an allergen immunotherapy regimen. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1995;74:241-6.
- Lower T, Hensy J, Mandik L, Janosky J, Friday GA Jr. Compliance with allergen immunotherapy. *Ann Allergy* 1993;70:480-2.
- Marogna M, Spadolini I, Massolo A, Canonica GW, Passalacqua G. Randomized controlled open study of SLIT for respiratory allergy in real life: clinical efficacy and more. *Allergy* 2004;59:1205-10.
- Lombardi C, Gani F, Landi M, Falagiani P, Bruno M, Canonica GW, et al. Quantitative assessment of the adherence to sublingual immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:1219-20.

doi:10.1016/j.jaci.2005.12.1312

## Airway inflammation in occupational asthma caused by styrene

To the Editor:

Styrene or phenylethylene has rarely been reported as a causative agent of occupational asthma.<sup>1-4</sup> This volatile monomer is widely used in the production of polymers, copolymers, and reinforced plastics and is a reactive solvent in the manufacture of unsaturated polyester resins. Styrene is known as an irritant to the skin and mucous

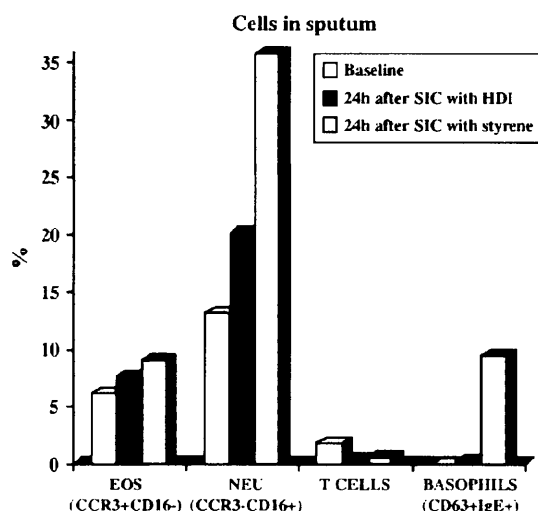
membranes and has been associated with dysfunction of the central nervous system. Workers in auto body shops may be exposed to styrene, because they use polyester resins in paints and car putty.

A 31-year-old man, a nonatopic and nonsmoker with persistent asthma, was referred for evaluation to the outpatient allergy clinic of our hospital. He had worked as a painter in an auto body shop for 4 years on a regular 8-hour shift during the day. He did not wear any protective equipment. During the last year, he had experienced sneezing, nasal discharge, ocular itching, and nasal stuffiness as well as dyspnea, dry cough, and wheezing when working. Asthma symptoms were more intense at the end of the work shift and at night, and he remained symptom-free during holidays and days off work. He handled paints containing hexamethylene diisocyanate (HDI) and polyester resins and hardeners that included in their composition styrene at a concentration of 10% to 25%, as disclosed by product labels and material data safety sheets.

He was evaluated 4 months after he had left his job because of asthma symptoms. After obtaining written informed consent, 3 single-blind specific inhalation challenges (SICs) were performed in a 7-m<sup>3</sup> challenge chamber on separate days. This chamber is made of lacquered stainless steel (Telstar Projects SA, Madrid, Spain) and equipped with vacuum exhaust and high-efficiency particle arrest filtration. On visit 1, PC<sub>20</sub> was measured, and sputum induction was performed. On visit 2, the patient painted placebo solution (polyol) with a brush onto a cardboard for 5 minutes. Spirometry was performed at 5, 10, 20, 30, 40, and 60 minutes after the inhalation challenge. From that moment, peak expiratory flow and FEV<sub>1</sub> were measured hourly with a computerized flowmeter (Amos, Jaeger, Germany) for 24 hours after challenge, respecting sleeping time. On visit 3, the patient underwent a SIC with HDI. Twenty-four hours later, on visit 4, methacholine inhalation test and sputum induction were performed again. Three days later, on visit 5, the patient painted the styrene solution (20 mL) on a cardboard for 4 minutes, and the following day, on visit 6, a methacholine inhalation test and sputum induction were performed.

Physical examination, blood tests, and spirometry results were normal. Specific IgE against diisocyanates measured in the patient's serum was negative. Specific IgE against styrene was assayed in duplicate by ELISA, using a concentration of 20 µg/mL and serum dilution series starting from 1:2 as described elsewhere,<sup>5</sup> and was also negative. Sputum was induced by hypertonic saline inhalation and processed as previously described (both with and without dithiothreitol).<sup>6</sup> Sputum samples were analyzed using flow cytometer scan cytometry (FACSCalibur flow cytometer; Becton Dickinson, San José, Calif). mAbs (Pharmingen, San Diego, Calif) used to identify cells were CD19, CD3, CD4, CD8, CD16, CD45, CCR3 (B and T lymphocytes, neutrophils, and eosinophils), CD63, and CDw125 (activated basophils).

At baseline (visit 1), PC<sub>20</sub> methacholine was 1 mg/mL. On visit 2 (sham exposure), no significant changes in FEV<sub>1</sub> were observed over the next 24 hours. On visit 3,



**FIG 1.** Comparison of differential cell counts in sputum at baseline and after specific inhalation challenge with HDI and styrene. Sputum eosinophils (CCR3<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>) and activated basophils (CD63<sup>+</sup>IgE<sup>+</sup>) increased 24 hours after styrene challenge compared with baseline and HDI challenge. EOS, Eosinophils; NEU, neutrophils.

SIC with HDI at a concentration of 15 ppb for 120 minutes elicited no reaction. No significant changes in FEV<sub>1</sub>, PC<sub>20</sub> methacholine, or cell counts in induced sputum were observed 24 hours after the HDI challenge. On visit 5, the styrene challenge elicited an isolated late asthmatic response, with a maximum fall in FEV<sub>1</sub> of 22% 11 hours after the provocation test. An increase in sputum eosinophils from  $0.02 \times 10^6$  to  $0.43 \times 10^6$  cells/mL and a striking increment of activated basophil counts in induced sputum were observed 24 hours after styrene SIC (Fig 1), but no significant changes were observed in PC<sub>20</sub> methacholine. The results of induced sputum analysis by flow cytometry did not vary with or without dithiothreitol.

Three subjects with suspected occupational asthma underwent the same challenge protocol with styrene, and no relevant changes in FEV<sub>1</sub> or PC<sub>20</sub> methacholine were observed (Table I). The increase in eosinophil and basophil counts in sputum after styrene SIC in the patient, as well as the negative results obtained with exposure to placebo and HDI, support the specificity of the airway reaction to styrene. A rise in eosinophil counts in sputum greater than  $0.26 \times 10^6$  cells/mL after SIC<sup>7</sup> or greater than 2% after exposure at work<sup>8</sup> are considered to be clinically significant. An increase in basophil counts in induced sputum has been found in atopic subjects with asthma<sup>9</sup> and subjects with occupational asthma<sup>10</sup> after SIC. Interestingly, the number of sputum basophils correlated with airway hyperresponsiveness to methacholine.<sup>9</sup>

Moscato et al<sup>2</sup> reported 2 workers with work-related asthma symptoms on exposure to styrene, and in both cases, SIC with styrene elicited early asthmatic reactions. Hayes et al<sup>3</sup> reported an air frame technician with occupational asthma caused by styrene in whom SIC with this agent provoked a dual asthmatic response and increased

**TABLE I.** PC<sub>20</sub> methacholine before and after SIC in the patient and 3 control subjects

	Baseline PC <sub>20</sub> (mg/mL)	PC <sub>20</sub> 24 h after SIC (mg/mL)	Maximum drop in FEV <sub>1</sub> (%)
Patient			
HDI SIC	1.0	2.3	5
Styrene SIC	2.3	2.7	22
Control 1			
Styrene SIC	1.8	2.7	3
Control 2			
Styrene SIC	1.7	2.0	5
Control 3			
Styrene SIC	>16	>16	4

responsiveness to inhaled histamine. However, evidence of lower airway inflammation had not been previously documented with styrene exposure. Öner et al<sup>4</sup> surveyed 47 workers of the furniture industry with a history of exposure to styrene. Although 3 workers had a positive methacholine test and 1 of them had a peak expiratory flow record compatible with occupational asthma, SIC with styrene in these 3 workers was negative.

Styrene is increasingly being used for the manufacture of a broad range of materials. This agent may elicit upper and lower airway symptoms as well as airway inflammation. Although the underlying mechanism causing these events is still unknown, it appears to be similar to other low-molecular-weight agents causing immunologic occupational asthma. The causative role of styrene in occupational rhinitis and asthma should be investigated among workers exposed to this compound.

Mar Fernández-Nieto, MD<sup>a</sup>

Santiago Quirce, MD, PhD<sup>a</sup>

Juan Fraj, MD<sup>b</sup>

Victoria del Pozo, PhD<sup>c</sup>

Carmen Seoane, BS<sup>c</sup>

Beatriz Sastre, BS<sup>c</sup>

Carlos Lahoz, MD, PhD<sup>c</sup>

Joaquín Sastre, MD, PhD<sup>a</sup>

From <sup>a</sup>the Department of Allergy, Fundación Jiménez Díaz, Av Reyes Católicos, 2, 28040 Madrid, Spain; <sup>b</sup>the Department of Allergy, Hospital Clínico, Zaragoza, Spain; and <sup>c</sup>the Department of Immunology, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain.

Disclosure of potential conflict of interest: The authors have declared they have no conflict of interest.

## REFERENCES

- Moscato G, Biscaldi GP, Brunetti G, Pugliese F, Candura F. Occupational asthma caused by styrene. *J Occup Med* 1984;26:552.
- Moscato G, Biscaldi G, Cottica D, Pugliese F, Candura F. Occupational asthma due to styrene: two case reports. *J Occup Med* 1987;29:957-60.
- Hayes JP, Lambourn L, Hopkirk JA, Durham SR, Taylor AJ. Occupational asthma due to styrene. *Thorax* 1991;46:396-7.
- Öner F, Mungan D, Numanoglu N, Demirel Y. Occupational asthma in the furniture industry: is it due to styrene? *Respiration* 2004;71:336-41.
- Fernandez-Caldas E, Quirce S, Marañón F, Díez Gomez ML, Gijón Botella H, López Roman R. Allergenic cross-reactivity between third stage larvae of *Hysterothylacium aduncum* and *Anisakis simplex*. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:554-5.
- Hadjicharalambous C, Dent G, May RD, Handy RL, Anderson IK, Davies DE, et al. Measurement of eotaxin (CCL11) in induced

- sputum supernatants: validation and detection in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:657-62.
7. Lemi re C, Chaboillez S, Malo JL, Cartier A. Changes in sputum cell counts after exposure to occupational agents: what do they mean? *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:1063-8.
  8. Girard F, Chaboillez S, Cartier A, Cote J, Hargreave FE, Labrecque M, et al. An effective strategy for diagnosing occupational asthma: use of induced sputum. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:845-50.
  9. Gauvreau GM, Lee JM, Watson RM, Irani AM, Schwartz LB, O'Byrne PM. Increased numbers of both airway basophils and mast cells in sputum after allergen inhalation challenge of atopic asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1473-8.
  10. Krakowiak A, Krawczyk-Adamus P, Dudek W, Walusiak J, Palczynski C. Changes in cellular and biochemical profiles of induced sputum after allergen-induced asthmatic response: method for studying occupational allergic airway inflammation. *Int J Occup Med Environ Health* 2005;18:27-33.

Available online March 8, 2006.  
doi:10.1016/j.jaci.2005.12.1350

## Prolonged elevation of serum tryptase in idiopathic anaphylaxis

To the Editor:

Idiopathic anaphylaxis is a well described type of anaphylaxis for which no identifiable provocative agent exists.<sup>1</sup> Serum tryptase levels, a marker of mast cell activation, can be used in the diagnosis of anaphylaxis.<sup>2</sup> Only 1 known case report exists of elevated tryptase levels in a patient who had a single episode of idiopathic anaphylaxis.<sup>3</sup> We describe the case of a patient with idiopathic anaphylaxis and an elevated mature tryptase level ~26 hours after the onset of symptoms.

The patient is a 54-year-old man who presented for office evaluation after having episodes of anaphylaxis for more than 10 years. Symptoms during his episodes included urticaria, pruritus, facial and extremity angioedema, nausea, vomiting, diarrhea, lightheadedness, syncope, and documented hypotension. The severity of his episodes was variable from mild symptoms of angioedema to more severe anaphylaxis with urticaria, angioedema, and hypotension necessitating emergency department admissions. The frequency of his episodes varied between 4 and 18 per year, with an apparent increase in frequency the year before his evaluation. History failed to reveal an inciting factor, including exercise, foods, medications, and insect stings. His past medical history was notable only for hypertension treated with amlodipine. His physical examination while asymptomatic was remarkable only for minimal nasal turbinate edema. Skin prick tests to a panel of 79 foods and spices were negative. Food dye and preservative challenges were also negative. Complete blood count with differential, general chemistries, C1 esterase inhibitor, and complement levels were normal.

Based on his history and laboratory evaluation, a diagnosis of idiopathic anaphylaxis was made. The patient was initially instructed to have a serum tryptase level measured with his next episode. Two months later, approximately 3 hours after eating breakfast, he developed pruritus and urticaria, mild swelling of his hands and feet, and

periorbital and lip edema, followed by throat tightness and severe gastrointestinal distress including nausea, vomiting, and diarrhea. He also experienced lightheadedness that was orthostatic in nature. He received no medical treatment for this episode and simply stayed at home. In the past, the patient had used self-injectable epinephrine, but he found the relief very short-lived and therefore stopped using it.

During this episode, he began a 24-hour urine collection for methylimidazoleacetic acid. His methylimidazoleacetic acid was elevated at 10.1 mg/24 h (normal < 5). Previous baseline 24-hour urine collection for histamine was normal.

The next day, his symptoms had resolved with the exception of a few urticarial lesions. Approximately 26 hours after the initial episode began, a serum tryptase level was measured at 110 ng/mL mature ( $\beta$ ) tryptase (normal mature tryptase < 1 ng/mL). All symptoms with the exception of urticaria had resolved by the time this serum sample was obtained. Baseline serum obtained 6 months and 2 years later revealed mature tryptase levels of <1 ng/mL and total tryptase levels of 2 and 3 ng/mL, respectively (normal total tryptase, 1-15 ng/mL). All tryptase assays were performed at Virginia Commonwealth University.

To our knowledge, this is just the second case report of an elevated serum tryptase level in a patient with idiopathic anaphylaxis. In the previous case report, no mention of baseline tryptase levels or follow-up was made.<sup>3</sup> The fact that our patient had transient elevations of mature ( $\beta$ ) tryptase and a urinary histamine metabolite with an acute episode and normal levels of both mature and total tryptase while asymptomatic strengthens the diagnosis of anaphylaxis involving mast cell activation and makes systemic mastocytosis unlikely. This patient has now been followed for 10 years, and although the frequency of his anaphylactic episodes has decreased substantially, no specific etiology has been determined. The mechanism of idiopathic anaphylaxis has yet to be elucidated, but it is important to make the diagnosis accurately early in the disease course, because the condition is known to recur.<sup>1</sup> Although further investigation is needed, serum tryptase levels obtained during or even after an episode of idiopathic anaphylaxis may aid in making the diagnosis correctly.

Previously, it has been shown that the half-life of serum mature tryptase is about 2 hours, and it has been suggested that tryptase should be checked within 4 hours of an anaphylactic episode.<sup>4</sup> This case is unique because the elevated tryptase level was drawn ~26 hours after the onset of symptoms and approximately 12 hours after resolution of all symptoms with the exception of a few urticarial lesions. This suggests that in some individuals with anaphylaxis, a serum tryptase may be elevated well beyond this 4-hour interval. In some patients suspected of having anaphylaxis, serum samples may be available only more than 4 hours after the episode. In such cases, determination of periacute and baseline tryptase levels may indeed be useful in securing a diagnosis of anaphylaxis involving mast cells.<sup>5</sup>





explanation for our findings in the study. In conclusion, we extended here our original findings of the effect of the probiotic strain in reducing risk of eczema through early childhood. Future studies are required to establish mechanisms of probiotic actions, also in the light of the novel barrier dysfunction theory, and their applicability in prevention of atopic disease.

We thank Johanna Hvitfelt-Koskelainen, RN, for her invaluable help in the follow-up of the participants.

Marko Kalliomäki, MD, PhD<sup>a</sup>

Seppo Salminen, PhD<sup>b</sup>

Tuija Poussa, MSc<sup>c</sup>

Erika Isolauri, MD, PhD<sup>a</sup>

From <sup>a</sup>the Department of Pediatrics and <sup>b</sup>the Functional Foods Forum, University of Turku, Turku, Finland; and <sup>c</sup>STAT Consulting, Tampere, Finland. E-mail: marko.kalliomaki@utu.fi.

Supported by the European Union (Early Nutrition Programming Project [EARNEST]), the Academy of Finland, and Turku University Hospital.

Disclosure of potential conflict of interest: E. Isolauri has received grant support from the University of Turku and the Academy of Finland. The rest of the authors have declared that they have no conflict of interest.

## REFERENCES

1. Rikoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by Toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004;118:229-41.
2. Bashir ME, Louie S, Shi HN, Nagler-Anderson C. Toll-like receptor 4 signaling by intestinal microbes influences susceptibility to food allergy. *J Immunol* 2004;172:6978-87.
3. Kalliomäki M, Kirjavainen P, Eerola E, Kero P, Salminen S, Isolauri E. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:129-34.
4. Kalliomäki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2001;357:1076-9.
5. Kalliomäki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H, Isolauri E. Probiotics and prevention of atopic disease: a 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2003;361:1869-71.
6. Williams H, Flohr C. How epidemiology has challenged 3 prevailing concepts about atopic dermatitis? *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:209-13.
7. Hanifin JM. Atopic dermatitis: do we need another confusing name for atopic dermatitis? *Br J Dermatol* 2002;147:430-2.
8. Pamer CAN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, et al. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet* 2006;38:441-6.
9. Majamaa H, Isolauri E. Evaluation of the gut mucosal barrier: evidence for increased antigen transfer in children with atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol* 1996;97:985-90.

Available online February 12, 2007.  
doi:10.1016/j.jaci.2006.12.608

## Characterization of allergens from the fish bait *Galleria mellonella*

### To the Editor:

Larvae of insects and worms used as live fish bait can be a cause of allergy in amateur fishers and occupationally exposed workers. Asthma, rhinitis, and contact urticaria have been associated with exposure and sensitization to *Galleria mellonella* larvae (bee moth) in anglers and breeders.<sup>1-4</sup> Villalta et al<sup>4</sup> described that bee moth's

allergenic proteins are thermolabile, and their presence depends on the stage of the larval development, the bee moth's hemolymph being the most likely source.

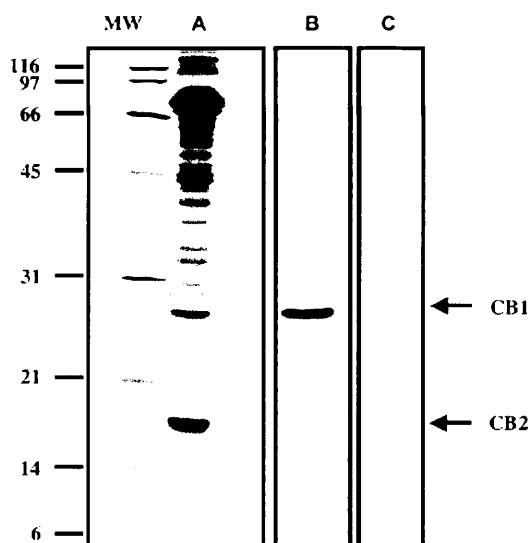
We report on a 49-year-old amateur fisher with a history of smoking and a fixed-drug eruption to tetracycline. In the previous 4 years, he had experienced several acute episodes of sneezing, nasal itching, watery nose, and tearing. During the previous year, he had also developed exercise-induced asthma. He employed only bee moth as bait. His symptoms were so bothersome that he had to stop fishing on some occasions, but he took no medications.

Physical examination and blood tests results were normal. Total serum IgE concentration was 152 IU/mL. Skin prick tests with common aeroallergens were positive to grass pollen. A skin prick test was performed by puncturing the live wax moth larvae and then pricking the subject's skin with the same lancet ("prick-by-prick" technique). A positive skin response (15-mm diameter wheal) was obtained in the patient, whereas it was negative in 10 healthy control subjects not exposed to the bee moth.

Spirometry was normal. Because of the possible exercise-induced asthma, a methacholine inhalation test was performed, which showed no airway hyperresponsiveness (PC<sub>20</sub> > 16 mg/mL). Induced sputum was obtained and analyzed by flow cytometry as previously described.<sup>5</sup> At baseline, induced sputum showed 1.14% eosinophils, 53.35% neutrophils, 1.13% lymphocytes, 42.62% macrophages, 0.02% eosinophilic precursors, and 0.70% activated basophils. Real-time polymerase chain reaction in induced sputum cells (Applied Biosystems, Foster City, Calif) revealed relative mRNA expression of IL-5 (0.47), IL-10 (1.12), IL-13 (0.36), and vascular endothelial growth factor (VEGF) (1.13). mRNA values were normalized with rRNA gene used as endogen.

Specific inhalation challenge (SIC) with wax moth extract was performed as previously described<sup>6</sup> in the patient and in 1 control nonatopic subject after obtaining written informed consent. The starting concentration for SIC was that eliciting a 3-mm wheal by end-point skin titration (0.01% weight/volume [wt/vol]). FEV<sub>1</sub> was then measured at 30 seconds, 5 minutes and 10 minutes after inhalation of the extract. Then, the extract concentration was duplicated until an FEV<sub>1</sub> fall of 20% or greater in the first 60 minutes was obtained. Rhinorrhea, tearing, and sneezing together with a 20% fall in FEV<sub>1</sub> was observed 30 minutes after the challenge (2.5% wt/vol). Subsequently, FEV<sub>1</sub> was monitored with a computerized asthma monitor (AM1 Jaeger, Hoechberg, Germany) every hour for the following 24 hours, and no late asthmatic response was obtained. SIC was negative in the control subject.

Twenty-four hours after SIC, bronchial hyperresponsiveness to methacholine increased (PC<sub>20</sub>, 3.5 mg/mL) only in the patient. The development of bronchial hyperresponsiveness to methacholine after SIC may explain why the patient experienced exercise-induced asthma, which may be related to recurrent exposures to bee moth when fishing.



**FIG 1.** *Galleria mellonella* protein identification. **A**, SDS-PAGE with *G mellonella* extract. **B**, Immunoblot with patient's serum. **C**, Immunoblot with control's serum. **CB1**, Apolipophorin III (24 kD); **CB2**, 27k hemolymph protein (18 kD).

Induced sputum showed 5.6% eosinophils, 41.3% neutrophils, 3.5% lymphocytes, 49.36% macrophages, and 0.06% activated basophils. Real-time quantitative polymerase chain reaction in sputum cells showed an augmented mRNA expression of IL-5 (0.72) and IL-13 (0.97), whereas IL-10 (0.52) and VEGF (0.95) expression did not change significantly.

Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) revealed several protein bands ranging from 6 kD to more than 116 kD. Immunoblotting was performed using the patient's serum diluted at 1/10, incubated overnight, and revealed with a second antibody (antihuman IgE; horseradish peroxidase [HRP], Serotec, Oxford, UK) diluted at 1/5000. Two IgE-binding bands were identified in the *G mellonella* extract of about 24 kD and 18 kD. These bands were extracted from the gel, digested with trypsin, and the proteins were identified by mass spectrometry (MS) using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight and/or liquid chromatography-electrospray ionization (liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry).<sup>7</sup> We used the National Center for Biotechnology Information database to compare the proteic sequences. These proteins corresponded to 27 kD hemolymph protein and apolipophorin III, respectively (Fig 1).

IgE-mediated allergy to *G mellonella*, a fishing bait widely used in Europe, has been previously reported.<sup>1-4</sup> Despite the fact that this arthropod is used in immunobiology to evaluate microbial pathogenicity, only a few of their proteins have been detected, purified, and characterized.<sup>8</sup>

We carried out the present study with the larval stage that the patient manipulated. When challenged, the patient developed a positive rhinoconjunctival and asthmatic reaction. Proteins recognized as allergens by this patient corresponded to a 27k hemolymph protein, a glycoprotein

precursor with an unknown function, and apolipophorin III, a protein that plays an important role in lipid transport and lipoprotein metabolism in insects.

We report 2 new allergens, 27k hemolymph protein and apolipophorin III, from *G mellonella* used as fish bait in a patient with rhinoconjunctivitis due to manipulation of this wax moth. The clinical and immunological studies confirmed the involvement of these allergens in the patient's respiratory symptoms.

Mauro F. Madero, MD<sup>a</sup>  
Alicia Enríquez-Matas, MD<sup>a</sup>  
Mar Fernández-Nieto, MD<sup>a</sup>  
Beatriz Sastre, BSc<sup>b</sup>  
Victoria del Pozo, PhD<sup>b</sup>  
Carlos Pastor, PhD<sup>b</sup>  
Santiago Quirce, MD, PhD<sup>a</sup>  
Joaquín Sastre, MD, PhD<sup>a</sup>

From the Departments of <sup>a</sup>Allergy and <sup>b</sup>Immunology, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain. E-mail: mmadero@fjd.es.

Disclosure of potential conflict of interest: M. F. Madero and B. Sastre have received grant support from Beca de Investigación "Jiménez Díaz" and Fundación Conchita Rabago de Jiménez Díaz. C. Pastor is employed by SIC Ingenieros SLL. S. Quirce and J. Sastre are employed by Fundación Jiménez Díaz. The rest of the authors have declared that they have no conflict of interest.

## REFERENCES

1. Siracusa A, Marcucci F, Spinozzi F, Marabini A, Pettinari L, Pace ML, Tacconi C. Prevalence of occupational allergy due to live fish bait. *Clin Exp Allergy* 2003;33:507-10.
2. Di Rienzo V, Falagiani P, Frati F, Sensi L, Marcucci F. Unusual IgE-mediated allergy to fish bait. *Allergy* 2002;57:869-70.
3. Siracusa A, Bettini P, Bacoccoli R, Severini C, Verga A, Abbritti G. Asthma caused by live fish bait. *J Allergy Clin Immunol* 1994;93:424-30.
4. Villalta D, Martelli P, Mistrello G, Roncarolo D, Zanoni D. Bee moth (*Galleria mellonella*) allergic reactions are caused by several thermolabile antigens. *Allergy* 2004;59:1002-5.
5. Fernandez-Nieto M, Quirce S, Fraj J, del Pozo V, Seoane C, Sastre B, et al. Airway inflammation in occupational asthma caused by styrene. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:948-50.
6. Quirce S, Fernandez-Nieto M, Bartolomé B, Bombín C, Cuevas M, Sastre J. Glucoamylase: another fungal enzyme associated with baker's asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002;89:197-202.
7. Gallego-Delgado J, Lazaro A, Osende JJ, Barderas MG, Duran MC, Vivanco F, et al. Comparison of the protein profile of established and regressed hypertension-induced left ventricular hypertrophy. *J Proteome Res* 2006;5:404-13.
8. Kavanagh K, Reeves EP. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 2004;28:101-12.

Available online March 10, 2007.  
doi:10.1016/j.jaci.2006.12.644

## Antiviral activity of human $\beta$ -defensin 3 against vaccinia virus

To the Editor:

Atopic dermatitis (AD) is a chronic inflammatory skin disorder that is associated with recurrent bacterial and viral skin infections.<sup>1</sup> This has prompted the Centers for Disease Control and Prevention to exclude individuals with AD from smallpox vaccination with vaccinia virus (VV)

## Occupational asthma and rhinitis caused by eugenol in a hairdresser

S. Quirce\*, M. Fernandez-Nieto, V. del Pozo, B. Sastre, J. Sastre

**Keywords:** eugenol; induced sputum; lymphocyte proliferation; occupational asthma; specific inhalation challenge.

Eugenol ( $C_{10}H_{12}O_2$ ) and its isomer isoeugenol are well-known skin sensitizers giving rise to allergic contact dermatitis (1) and acute urticaria (2). These fragrance chemicals, however, have not been previously described as a causative agent of occupational asthma (OA).

We report the case of a 30-year-old hairdresser, a nonsmoker. In the last year he had developed eczema on his hands and he had suffered from nasal stuffiness and rhinorrhea. Over the last 6 months at work he had also developed episodes of chest tightness, dry cough and shortness of breath upon exposure to perfumes and lacquer. His asthma symptoms worsened progressively and he was treated in the emergency room because of severe asthma attacks on three occasions. He showed a marked improvement away from work. When he was examined in our outpatient clinic he had been on a sick leave for 6 months. At that time spirometry was normal. Blood tests and leukocyte differential count ( $102$  eosinophils/ $mm^3$ ) were within normal limits. Total serum IgE was  $168$  kU/l.

**A hairdresser developed rhinitis and asthma following occupational exposure to eugenol-containing perfumes, confirmed by specific inhalation challenge.**

Patch testing with European standard series showed positive results to cobalt chloride, potassium dichromate, fragrance mix and isoeugenol (+). Skin prick testing was performed with common aeroallergens, latex and eugenol 2% w/v and all yielded negative results.

Specific inhalation challenge (SIC) with eugenol was performed by a 2 min nebulization of the corresponding eugenol dilution in a  $7\text{ m}^3$  challenge chamber (3, 4). Sputum was induced by hypertonic saline inhalation and processed as previously described (4). Sputum samples were analyzed using FC scan cytometry (FACSCalibur flow cytometer; Becton Dickinson, San José, CA, USA).

At baseline (visit 1),  $PC_{20}$  methacholine was negative ( $PC_{20} > 16\text{ mg/ml}$ ). On visit 2 (sham exposure) no significant changes in forced expiratory volume in 1 s ( $FEV_1$ ) were observed over the following 24 h. On visit 3, SIC with eugenol at a dilution of  $1/10\ 000$  for 2 min elicited no reaction. On visit 4, the eugenol challenge at  $1/1000$  elicited rhinitis symptoms and an isolated late asthmatic response. An increase in sputum eosinophils and lymphocytes were observed 24 h after eugenol SIC (Table 1), and methacholine inhalation test became positive ( $PC_{20}$   $2\text{ mg/ml}$ ). A hairdresser

diagnosed with OA caused by persulfates (control subject) underwent the same challenge protocol with eugenol and no relevant changes in  $FEV_1$  or  $PC_{20}$  methacholine were observed.

Proliferation tests of peripheral blood mononuclear cells from the patient and the control subject were performed by MTS assays (Promega Corp., Madison, WI, USA) with different eugenol dilutions in RPMI-1640 completed with 10% FBS. A striking difference in the eugenol-induced proliferation was observed in the patient (15 times higher) as compared to the control subject with the eugenol  $1/1000$  dilution, whereas no significant difference was observed in the eugenol-induced proliferation between the patient and the control subject at the  $1/100$  and  $1/10\ 000$  dilutions.

Baur et al. (5) reported a 44-year-old woman, employed for 26 years in a drugstore, who developed asthma symptoms while presenting customers with various perfume brands. Work-place-related specific challenges with nine different brands of perfumes as well as SIC with one individual perfume in this patient resulted in increased nasal airflow resistance and in significant bronchial obstruction (5). Although the major agents involved in OA and rhinitis in

Table 1. Total and differential cell count (cells/ml) in induced sputum at baseline and 24 h after specific inhalation challenge with eugenol ( $1/1000$  v/v). A marked increase in the number of eosinophils (activated) and lymphocytes is observed

	At baseline ( $\times 10^6/\text{ml}$ )	Post eugenol SIC ( $\times 10^6/\text{ml}$ )	Increment (fold)
Total cell counts	2.36	8.38	3.55
Eosinophils	0.087	0.36	4.13
Neutrophils	1.96	5.8	2.96
Macrophages	0.298	2.11	7.1
Lymphocytes	0.005	0.059	11.8
Basophils	0.026	0.052	2
Eosinophil precursors	0.003	0.013	4.33
Eosinophils CD69 +	0.0004	0.003	7.5
Eosinophils CD25 +	0.0002	0.003	15
Eosinophils DR +	0.0009	0.004	4.44

hairdressers are persulfates, and to a lesser extent permanent hair dyes, latex and paraphenylenediamine (6), these workers are also routinely exposed to perfumes and cosmetics containing eugenol (1).

The late asthmatic response and the increase in eosinophil and lymphocyte counts in sputum after eugenol SIC in the patient support the specificity of the airway reaction to eugenol. The causative role of eugenol in occupational rhinitis and asthma should be investigated among hairdressers, beauty shop and drugstore workers, and in dental personnel exposed to this compound.

## Acknowledgments

This study was supported by Foundation SEAIC (Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica).

\*Fundación Jiménez Díaz  
Servicio de Alergia  
Av. Reyes Católicos, 2  
28040 Madrid  
Spain  
Tel.: +34 91 550 49 05  
Fax: +34 91 549 94 98  
E-mail: squirce@gmail.com

Accepted for publication 10 July 2007  
Allergy 2008; 63:137–138  
© 2007 The Authors  
Journal compilation © 2007 Blackwell  
Munksgaard  
DOI: 10.1111/j.1398-9995.2007.01525.x

## References

- Johansen JD, Rastogi SC, Menné T. Contact allergy to popular perfumes assessed by patch test, use test and chemical analysis. *Br J Dermatol* 1996;135:419–422.

- Bhalla M, Thami GP. Acute urticaria due to dental eugenol. *Allergy* 2003;58:158.
- Quirce S, Baeza ML, Tornero P, Blasco A, Barranco R, Sastre J. Occupational asthma caused by exposure to cyanoacrylate. *Allergy* 2001;56:446–449.
- Fernandez-Nieto M, Quirce S, Fraj J, del Pozo V, Seoane C, Sastre B et al. Airway inflammation in occupational asthma caused by styrene. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:948–950.
- Baur X, Schneider EM, Wieners D, Czuppon AB. Occupational asthma to perfume. *Allergy* 1999;54:1328–1336.
- Moscato G, Pignatti P, Yacoub MR, Romano C, Spezia S, Perfetti L. Occupational asthma and occupational rhinitis in hairdressers. *Chest* 2005;128:3590–3598.

## Injection site reactions to TNF- $\alpha$ blocking agents with positive skin tests

M. Benucci\*, M. Manfredi, P. Demoly, P. Campi

**Key words:** adalimumab; drug eruptions; etanercept; skin tests; tumor necrosis factor- $\alpha$  antagonists.

Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) antagonists (infliximab, etanercept, and adalimumab) have dramatically improved the quality of life of patients with rheumatoid arthritis (RA) and psoriatic arthritis (PA). Both immediate and delayed adverse reactions have been described, suggesting type I and III hypersensitivity mechanisms; however,

immunoglobulin (Ig) E-mediated or cell-mediated reactions have never been demonstrated. We describe here injection site reactions (ISR)

consisting in edema, erythema, and itching of at least 5–6 cm in diameter and lasting for 4–5 days. Two patients with RA received subcutaneous administration of etanercept, a soluble recombinant TNF receptor : Fc fusion protein, and two patients with PA received adalimumab, a recombinant fully human monoclonal antibody anti-TNF- $\alpha$ .

Case 1: A 62-year-old female treated with methylprednisolone, hydroxychloroquine, and methotrexate. Since the second administration of etanercept, 50 mg/week, an ISR occurred after 6 h.

Case 2: A 58-year-old female treated with methylprednisolone and methotrexate. After 5 years of therapy with etanercept, 50 mg/week, she noticed an ISR occurring quickly after 5 min, peaking at 30 min and lasting for 4 days.

Case 3: A 65-year-old male. Since the third dose of adalimumab, 40 mg/every other week, an ISR occurred after 24 h.

Case 4: A 61-year-old female. Since the sixth dose of adalimumab, 40 mg/every other week, she noticed, after 12 h, an ISR which lasted for 3–4 days.

All the patients were not atopic and had normal levels of total IgE.

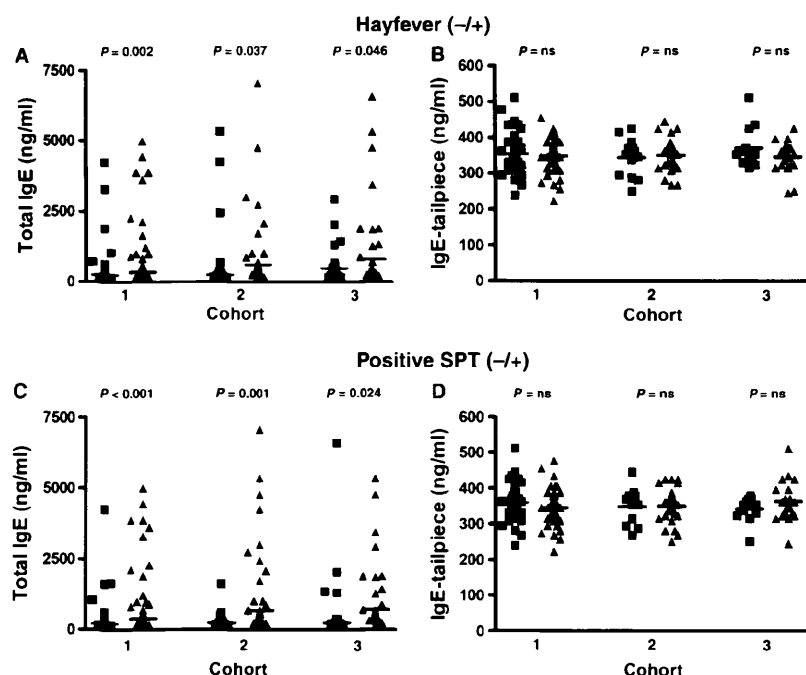
A vial of Enbrel (25 mg etanercept, 40 mg mannitol, 10 mg sucrose, 1.2 mg tromethamine in 1 ml water) and a prefilled pen of Humira (40 mg

**Four patients with injection site reactions to etanercept and adalimumab and positive intradermal tests.**

Table 1. Results of skin tests

	Etanercept*					Adalimumab*			
	Prick	Intradermal				Prick	Intradermal	Intradermal	Patch
Reading	20 min	15 min	15 min	15 min	24–48 h	20 min	15 min	24–48 h	24–48 h
Concentration (mg/ml)	25	5	1	0.1	5	50	5	50	50
Controls (10)	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Case 1	0/0	7/12	7/10	5/5	0/0				
Case 2	0/0	6/15	6/6	0/0	0/0				
Case 3						0/0	0/0	7/7	0/0
Case 4						0/0	0/0	7/15	0/0

\*Diameter in millimeter of wheal/flare.



**Figure 1.** Plasma total IgE and IgE-tailpiece levels in the presence and absence of atopy. Total IgE (A, C) and IgE-tailpiece (B, D) levels were investigated in plasma taken from families with multiple-asthma children. These families were divided into non-related individuals, cohort 1 parents ( $n = 80$ ), cohort 2 asthma sibling A ( $n = 33$ ) and cohort 3 asthma sibling B ( $n = 34$ ). Atopy was defined by the presence of hayfever (questionnaire) or positive skin prick test (SPT) to common allergens. Total IgE data were not normally distributed (histogram not shown); therefore, medians were compared using the Mann-Whitney U-test. IgE-tailpiece data were normally distributed (histogram not shown) and therefore means were compared using Student's *t*-test. Data represent all data points in the absence (squares) or presence (triangles) of atopy with median or mean values shown for total IgE and IgE tailpiece, respectively.

levels of IgE and lung function. The task ahead will be to investigate IgE-tp levels in other conditions, such as helminth infection, where total IgE levels are far higher than that for allergy and the Th2 immune response is more prominent (6).

We thank Professor Ian Hall for providing access to the Nottingham Family samples. We would also like to thank Professor Sherie Morrison (University of California, Los Angeles) and Dr Ke Zhang (University of California, Los Angeles) for their kind gifts of the recombinant human IgE-Tp and anti-IgE-Tp specific monoclonal Ab 367, respectively.

\*School of Pharmacy  
Centre for Biomolecular Sciences  
University of Nottingham  
Nottingham NG7 2RD  
UK  
Tel.: +44 (0) 115 8230327  
Fax: +44 (0) 115 8468002  
E-mail: akhmed.aslam@nottingham.ac.uk

Accepted for publication 13 February 2008  
Allergy 2008; 63:942–943  
© 2008 The Authors  
Journal compilation © 2008 Blackwell  
Munksgaard  
DOI: 10.1111/j.1398-9995.2008.01708.x

#### References

1. Pekkarinen PT, von Hertzen L, Laatikainen T, Mäkelä MJ, Jousilahti P, Kosunen TU et al. A disparity in the association of asthma, rhinitis, and eczema with allergen-specific IgE between Finnish and Russian Karelia. *Allergy* 2007;**62**:281–287.
2. Ballardini N, Nilsson C, Nilsson M, Lilja G. ImmunoCAP Phadiatop infant – a new blood test for detecting IgE sensitisation in children at 2 years of age. *Allergy* 2006;**61**:337–343.
3. Chan LA, Lyczak JB, Zhang K, Morrison SL, Saxon A. The novel human IgE epsilon heavy chain, epsilon tailpiece, is present in plasma as part of a covalent complex. *Mol Immunol* 2000;**37**:241–252.

4. Aslam A, Quinn P, McIntosh RS, Shi J, Ghumra A, McKerrow JH et al. Proteases from *Schistosoma mansoni* cercariae cleave IgE at solvent exposed interdomain regions. *Mol Immunol* 2008;**45**:567–574.
5. Wheatley AP, Bolland DJ, Hewitt JE, Dewar JC, Hall IP. Identification of the autoantigen SART-1 as a candidate gene for the development of atopy. *Hum Mol Genet* 2002;**11**:2143–2146.
6. Yazdanbakhsh M, Kreamsner PG, van Ree R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science* 2002;**296**:490–494.

### Occupational asthma due to tampico fiber from agave leaves

S. Quirce\*, M. Fernández-Nieto, C. Pastor, B. Sastre, J. Sastre

**Key words:** exhaled nitric oxide; induced sputum; occupational asthma; specific inhalation challenge; tampico fiber.

Tampico fiber is extracted from the leaves of *Agave lechugilla* which grows mainly in Mexico. The material is used

extensively for making yard brooms, deck brushes and bath brushes. Agave-induced irritant contact dermatitis has been previously reported among workers with *Agave tequilana* for tequila making (1, 2). Allergic reactions caused by tampico fibers have not been previously reported.

We surveyed the five employees (two supervisors and three machine operators) at a brush making-plant. The two supervisors (patients 1 and 2), who were brothers and had been exposed to tampico for 13 and 10 years, respectively, reported work-related rhinitis and asthma symptoms. Patient 1 also experienced localized contact urticaria with tampico fiber. Patient 1 had experienced

**Two brush-making workers who developed asthma and rhinitis symptoms following occupational exposure to tampico fiber are reported.**

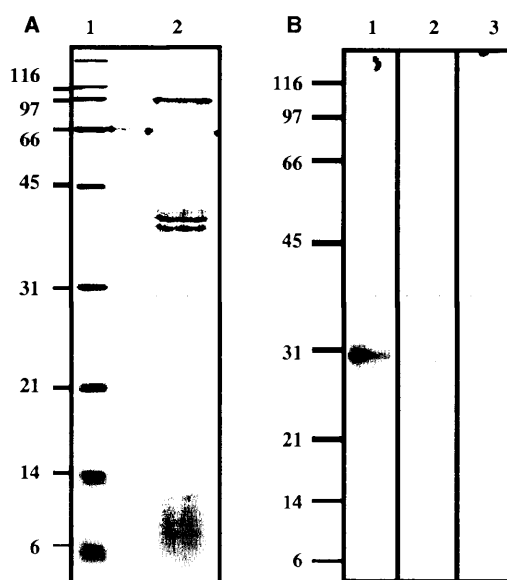


Figure 1. SDS-PAGE (A) and immunoblotting (B) of tampico fibers showing IgE-binding bands with serum from the two patients (lanes 1 and 2) and no reactivity with negative control serum (lane 3).

rhinitis and asthma symptoms for 10 and 2 years, and patient 2 for 8 and 5 years, respectively. The remaining workers did not report symptoms at work. Exhaled nitric oxide (eNO) measurements (Nioxmino; Aerocrine, Solna, Sweden) performed at the end of the work shift were elevated only in the two symptomatic employees (44 and 83 ppb), whereas they were normal in the remaining workers (< 23 ppb). The mean concentration of total dust particles in the brush-making plant during an ordinary work shift using a laser-based aerosol monitor (DustTrack model 8520; TSI, St. Paul, MN, USA) was  $0.42 \text{ mg/m}^3$  (range: 0.28–0.68).

After obtaining written informed consent, single blind specific inhalation challenges (SIC) were carried out. On visit 1, methacholine inhalation test and sputum induction was performed. On visit 2, the patients underwent a SIC with nebulized aqueous tampico extract (3). Twenty-four hours later, on visit 3, sputum induction was performed again. On visit 4, a week apart from the tampico SIC, the patients underwent a SIC with horsehair extract.

Spirometry results were normal. Sputum was processed as previously described (4) and analyzed using FC scan cytometry (FACSCalibur flow cytometer; Becton Dickinson, San José, CA, USA). Monoclonal antibodies (Pharmingen, San Diego, CA, USA) used

to identify sputum cells are described elsewhere (4).

Skin prick testing with tampico extract 10% w/v was positive in patient 1 (5 mm) and patient 2 (3 mm), whereas it was negative with horsehair extract. Both patients also had positive skin prick tests to grass pollen, and patient 2 to house dust mites and cat and dog dander. The remaining workers had negative skin tests to tampico and horsehair extracts.

PC<sub>20</sub> methacholine was 0.9 mg/ml (patient 1) and 8 mg/ml (patient 2). SIC with tampico at 10% w/v elicited an isolated early asthmatic response in both patients. An increase in sputum total cell count and neutrophils count (about threefold) as well as in eosinophil counts (fourfold) in induced sputum were observed 24 h after SIC. Two subjects with asthma underwent the same challenge protocol with tampico and no relevant changes in forced expiratory volume in 1 s or sputum were observed. The increase in eosinophil counts in sputum after tampico SIC in the patients, as well as the negative results obtained with exposure to horsehair support the specificity of the airway reaction to tampico. There is still conflicting evidence regarding the usefulness of eNO in the investigation of occupational asthma (5). A study reported an increase of eNO in individuals with symptoms of asthma when exposed to laboratory animals (6).

Sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis revealed several protein bands ranging from 14 to 97 kDa (Fig. 1A). Immunoblotting was performed using the patient's serum diluted at 1/10, incubated overnight, and revealed with a second antibody (antihuman IgE) diluted at 1/5000. Three IgE-binding bands were recognized in the tampico extract of about 31, 39 and 43 kDa (Fig. 1B). These results point out that tampico fibers may give rise to upper and lower airway symptoms as well as to airway inflammation through an IgE-dependent mechanism.

\*Hospital Universitario La Paz  
Servicio de Alergia  
P. Castellana, 261  
28046 Madrid  
Spain  
Tel.: +34 91 727 7080  
Fax: +34 91 549 94 98  
E-mail: squirec@gmail.com

Accepted for publication 19 February 2008  
Allergy 2008; 63:943–945  
© 2008 The Authors  
Journal compilation © 2008 Blackwell Munksgaard  
DOI: 10.1111/j.1398-9995.2008.01711.x

## References

- Ogura T. Irritant contact dermatitis caused by needle-like calcium oxalate crystals, raphides, in *Agave tequilana* among workers in tequila distilleries and agave plantations. *Contact Dermatitis* 2001;44:94–96.
- High WA. Agave contact dermatitis. *Am J Contact Dermatitis* 2003;14:213–214.
- Quirce S, Fernández-Nieto M, Escudero C, Cuesta J, de Las Heras M, Sastre J. Bronchial responsiveness to bakery-derived allergens is strongly dependent on specific skin sensitivity. *Allergy* 2006;61:1202–1208.
- Fernández-Nieto M, Quirce S, Fraj J, del Pozo V, Seoane C, Sastre B et al. Airway inflammation in occupational asthma caused by styrene. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:948–950.
- Lemière C. Induced sputum and exhaled nitric oxide as noninvasive markers of airway inflammation from work exposures. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007;7:133–137.

6. Adisesh LA, Kharitonov SA, Yates DH, Snashell DC, Newman-Taylor AJ, Barnes PJ. Exhaled and nasal nitric oxide is increased in laboratory animal allergy. *Clin Exp Allergy* 1998;28:876-880.

## Serum vascular endothelial growth factor and sublingual immunotherapy

G. Ciprandi\*, B. M. Colombo, G. Murdaca, M. De Amici

**Key words:** allergic rhinitis; sublingual immunotherapy; vascular endothelial growth factor.

Allergic rhinitis (AR) is characterized by an inflammatory reaction, sustained by Th2 polarization (1). In this regard, angiogenesis is a complex and multifaceted process including endothelial cell proliferation and migration, recruitment of pericytes, and a maturation process (2). This sequence is tightly integrated and mediated by a balance between pro-angiogenic factors, including vascular endothelial growth factor (VEGF), angiopoietins, angiogenins, and a range of chemokines, and

**Vascular endothelial growth factor serum level is reduced in allergic patients, sublingual immunotherapy increases it.**

anti-angiogenic factors, such as endostatin and constatin. Anyway, the most necessary and sufficient angiogenic protein is VEGF.

Vascular endothelial growth factor has been implicated as a driver not only of airway angiogenesis but also of enhanced allergic sensitization, upregulated Th2 inflammatory response, mucus gland hyperplasia, induction of metalloproteinase, chemotaxis for monocytes and eosinophils, airway edema, and airway hyperreactivity (3). Recently, it has been shown that VEGF is over-expressed in the nasal mucosa of patients with seasonal AR (4) and might be associated with the link between rhinitis and asthma (5). Sublingual immunotherapy (SLIT) is the unique causal treatment for AR affecting immune response (6).

Thus, the aim of this preliminary study was to evaluate serum VEGF levels in a cohort of AR patients, enrolled outside pollen season, and treated with a preseasonal course (3 months) of SLIT (Anallergo, Florence, Italy) and compared with healthy controls.

Forty patients (19 males and 21 females, mean age 38.86 years), with pollen allergy, and 15 normal subjects (eight males and seven females, mean age 43 years) were evaluated. Patients' blood samples for assessing VEGF serum levels were collected before initiating SLIT (baseline), after 3 month preseasonal SLIT course, and three months after.

The study was conducted with the approval of the local Ethics Committee and performed with the written informed consent of all participants.

The human VEGF Immunoassay (R&D Systems, Milan, Italy) was performed according to the Manufacturer's Instructions and expressed as  $\mu\text{g/ml}$ .

The Wilcoxon test and Pearson's test were used for statistical analyses. The package 's-PLUS' (MathSoft Corp, Rome, Italy) was used for all analyses.

Vascular endothelial growth factor serum levels were  $532.09 \text{ pg/ml}$  ( $\pm 262.6 \text{ SD}$ ) in normal subjects. In allergic patients, VEGF serum levels were  $159.92 \text{ pg/ml}$  ( $\pm 408.29 \text{ SD}$ ) at baseline and were significantly lower than in normal subjects ( $P = 0$ ) as reported in Fig. 1. At the end of preseasonal SLIT course, i.e. after 3 months, VEGF serum levels significantly increased to  $373.10 \text{ pg/ml}$  ( $\pm 264.98 \text{ SD}$ ) in comparison with baseline levels. After 3 months, VEGF further increased to  $404.65 \text{ pg/ml}$  ( $\pm 206.99 \text{ SD}$ ), but without significant difference with the previous one. Finally, there was a significant correlation between times ( $P = 0.0005$ ).

The findings of this preliminary study are surprising for two main reasons: firstly VEGF serum levels are significantly lower in AR patients than in normals. It is completely conflicting with previous studies (4, 5). However, these studies were conducted in symptomatic patients as exposed to pollens, whereas our patients were symptomless as they were initially studied outside the pollen season.

Secondly, SLIT induced an increase of VEGF serum levels. It may appear a paradox as VEGF may be considered a marker of allergic inflammation as it was reported to be over-expressed during acute phase of pollen AR. However, it is well known that SLIT is able to reduce the severity of allergic symptoms and the use of rescue medications down-regulating Th2-mediated inflammation (6).

A possible hypothesized explanation of this aberrant phenomenon might be that the VEGF over-expression mainly occurs at the level of the target organ, such as the nose, where it is effectively and significantly increased. Thus, this local 'capture' might justify the low 'peripheral' VEGF levels in basal conditions. Moreover, VEGF serum levels might reduce at nasal levels and consequently increase in the serum after SLIT.

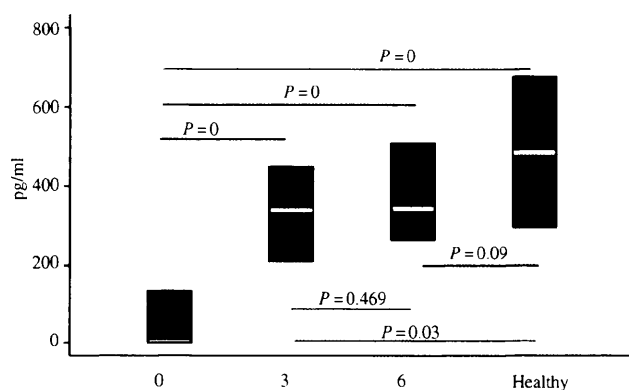


Figure 1. VEGF serum levels in patients with pollen AR evaluated before (0), after a 3-month preseasonal SLIT course (3), and after 3 months (6), and in healthy subjects.





VIT, provided the cells are stimulated submaximally. As summarized in the Figure, the observation that VIT decreases basophil sensitivity is confirmed in an extended analysis of 35 patients who stopped VIT after 5 years of treatment. Moreover, basophil sensitivity remains decreased after discontinuing VIT for 1 year.

In conclusion, although not all issues have been resolved, the BAT is a reliable additional tool for the diagnosis of hymenoptera venom allergy. With respect to the follow-up of VIT, there is evidence that treatment decreases the sensitivity of basophils and the BAT to the extent that therapy cannot be successfully monitored.

## References

1. Dubois AE, van der Heide S. Basophil-activation tests in Hymenoptera allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2007;7:346-9.
2. Ebo DG, Sainte-Laudy J, Bridts CH, Mertens CH, Hagendorens MM, Schuerwegh AJ, De Clerck LS, Stevens WJ. Flow-assisted allergy diagnosis: current applications and future perspectives. *Allergy* 2006;61:1028-39.
3. Erdmann SM, Sachs B, Kwiecien R, Moll-slodowy S, Sauer I, Merk H. The basophil activation test in wasp venom allergy: sensitivity, specificity and monitoring specific immunotherapy. *Allergy*. 2004;59:1102-9.
4. Ebo DG, Hagendorens MM, Schuerwegh AJ, Beirens LM, Bridts CH, De Clerck LS et al. Flow-assisted quantification of in vitro activated basophils in the diagnosis of wasp venom allergy and follow-up of wasp venom immunotherapy. *Cytometry B Clin Cytom*. 2007;72:196-203.
5. Ebo DG, Hagendorens MM, Bridts CH, Schuerwegh AJ, De Clerck LS, Stevens WJ. Should we follow the flow: response by authors. *Clin Exp Allergy*. 2004;34:1499-50.
6. Ocmant A, Peignois Y, Mulier S, Hanssens L, Michils A, Schandene L. Flow cytometry for basophil activation markers: the measurement of CD203c up-regulation is as reliable as CD63 expression in the diagnosis of cat allergy. *J Immunol Methods*. 2007;320:40-8.
7. Ebo DG, Dombrecht EJ, Bridts CH, Aerts NE, De Clerck LS, Stevens WJ. Combined analysis of intracellular signalling and immunophenotype of human peripheral blood basophils by flow cytometry: a proof of concept. *Clin Exp Allergy*. 2007;37:1668-75.
8. Bonifazi F, Jutel M, Bilo BM, Birnbaum J, Muller U. Prevention and treatment of hymenoptera venom allergy: guidelines for clinical practice. *Allergy*. 2005;60:1459-70.
9. Ebo DG, Hagendorens MM, Bridts CH, De Clerck LS, Stevens WJ. Hymenoptera venom allergy: taking the sting out of difficult cases. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2007;17:357-60.
10. Peterneij A, Silar M, Erzen R, Kosnik M, Korosec P. Basophil sensitivity in patients not responding to venom immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2008;146:248-54.

## Nonasthmatic Eosinophilic Bronchitis in a Baker Caused by Fungal $\alpha$ -Amylase and Wheat Flour

P Barranco,<sup>1</sup> M Fernández-Nieto,<sup>2,3</sup> V del Pozo,<sup>3,4</sup> B Sastre,<sup>3,4</sup> JI Larco,<sup>1</sup> S Quirce<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Allergy Department, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain

<sup>2</sup>Allergy Department, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

<sup>3</sup>Spanish Network of Centers for Biomedical Research on Respiratory Diseases (CibeRes), Spain

<sup>4</sup>Immunology Department, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

**Key words:** Eosinophilic bronchitis. Induced sputum.  $\alpha$ -amylase. Wheat flour.

**Palabras clave:** Bronquitis eosinofílica. Espudo inducido. Alfa-amilasa. Harina de trigo.

Nonasthmatic eosinophilic bronchitis is characterized by chronic cough, sputum eosinophilia, and absence of airway hyperresponsiveness to methacholine. Some cases of eosinophilic bronchitis are caused by work-related exposure to low- and high-molecular-weight allergens [1,2].

We describe the case of a 51-year-old nonsmoking woman who had been in charge of a bakery-pâtisserie for 14 years. She presented with an 8-year history of persistent chronic cough and tenacious sputum, but no wheezing or dyspnea. Her symptoms improved during holidays and nonworking days and worsened during workdays, especially when she was close to the bakery workroom. She had taken antitussive medication with no clinical improvement. Common causes of chronic cough, including gastroesophageal reflux, were ruled out.

The results of the physical examination were normal, as were the chest and sinus radiography findings. The absolute eosinophil count in peripheral blood was 100/ $\mu$ L. Skin prick tests were performed with wheat, rye, corn, barley, soy, oat flour extracts (5% w/v), fungal  $\alpha$ -amylase (1 mg/mL), and common aeroallergens supplied by Bial-Aristegui (Bilbao, Spain) and ALK-Abelló (Madrid, Spain). Skin prick testing was positive for fungal  $\alpha$ -amylase (12-mm wheal) and negative for the other allergens tested, including wheat flour. The total serum immunoglobulin (Ig) E level (Phadia CAP, Uppsala, Sweden) was 142 kU<sub>A</sub>/L. Serum-specific IgE to fungal  $\alpha$ -amylase was 3.83 kU<sub>A</sub>/L, and to wheat flour 1.07 kU<sub>A</sub>/L. IgE determinations to other cereal flours and baking additives were negative.

Spirometry revealed a forced vital capacity (FVC) of 3.7 L (106% predicted), a forced expiratory volume in 1 second (FEV<sub>1</sub>) of 3.2 L (108% predicted) and a ratio of FEV<sub>1</sub> to FVC of 87%, with no significant changes after inhalation of salbutamol. Methacholine inhalation testing with the dosimeter method was performed on 3 separate occasions and did not reveal bronchial hyperresponsiveness (provocative concentration leading to a 20% fall in baseline FEV<sub>1</sub> > 16 mg/mL). Peak expiratory flow monitoring for 15 days at work and 15 days off work revealed

■ Manuscript received June 4, 2008; accepted for publication June 23, 2008.

**W Stevens**

Faculty of Medicine  
Dept. Immunology - Allergology - Rheumatology  
University of Antwerp  
Universiteitsplein 1  
B-2610 Antwerpen  
E-mail: immuno@ua.ac.be

no significant daily variability. Specific inhalation challenge (SIC) was performed with fungal  $\alpha$ -amylase and with wheat flour as previously described [3]. The patient developed dry cough during the challenges, but neither asthmatic reactions nor changes in methacholine responsiveness were observed 24 hours after the SIC.

Differential cell counts in induced sputum samples [4] showed 4.2% eosinophils when the patient was at work (within 24 h of an ordinary shift), and 1.1% after a period of 2 weeks away from work (baseline). SIC was performed again with  $\alpha$ -amylase and 4 weeks later with wheat flour, and no asthmatic responses were observed. Results of the methacholine inhalation tests 24 h after the SICs were negative again. However, the differential cell count in induced sputum increased from less than 2% eosinophils to 33.3% 24 hours after SIC with  $\alpha$ -amylase, and to 12.4% 24 hours after the SIC with wheat flour.

The patient was diagnosed with occupational eosinophilic bronchitis due to sensitization to fungal  $\alpha$ -amylase and wheat flour. After 3 months of treatment with budesonide (800  $\mu$ g daily) the cough subsided completely.

The causative agents of eosinophilic bronchitis in the workplace have rarely been established [1,2]. Challenge exposure to acrylate-containing glue in a worker at a company that produced weather strips for vehicles [1], to latex gloves in a nurse [2], and to wheat flour in a baker [5] resulted in a marked increase in sputum eosinophilia in the absence of both airflow obstruction and bronchial hyperresponsiveness. In addition, occupational eosinophilic bronchitis caused by low-molecular-weight agents such as diisocyanates [5], welding fumes [6], formaldehyde [6], and chloramine-T [7] has also been reported.

It is not known why patients with eosinophilic bronchitis do not have airway hyperresponsiveness despite the eosinophilic bronchial inflammation. A recent study suggests that the difference in airway function observed in subjects with eosinophilic bronchitis and asthma could be due to differences in prostaglandin  $E_2$  production in the airways [8].

## References

1. Lemi re C, Efthimiadis A, Hargreave FE. Occupational eosinophilic bronchitis without asthma: an unknown occupational airway disease. *J Allergy Clin Immunol*. 1997;100:853-3.
2. Quirce S. Eosinophilic bronchitis in the workplace. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2004;4:87-91.
3. Quirce S, Fernández-Nieto M, Escudero C, Cuesta J, de Las Heras M, Sastre J. Bronchial responsiveness to bakery-derived allergens is strongly dependent on specific skin sensitivity. *Allergy*. 2006;61:1202-8.
4. Fernández-Nieto M, Quirce S, Fraj J, del Pozo V, Seoane C, Sastre B, Lahoz C, Sastre J. Airway inflammation in occupational asthma caused by styrene. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117:948-50.
5. Di Stefano F, Di Giampaolo L, Verna N, Di Giacacchino M. Occupational eosinophilic bronchitis in a foundry worker exposed to isocyanate and a baker exposed to flour. *Thorax*. 2007;62:368-70.
6. Yacoub MR, Malo JL, Labrecque M, Cartier A, Lemi re C. Occupational eosinophilic bronchitis. *Allergy*. 2005;60:1542-4.
7. Krakowiak AM, Dudek W, Ruta U, Palczynski C. Occupational eosinophilic bronchitis without asthma due to chloramine exposure. *Occup Med (Lond)*. 2005;55:396-8.
8. Sastre B, Fernández-Nieto M, Moll  R, López E, Lahoz C, Sastre J, del Pozo V, Quirce S. Increased prostaglandin  $E_2$  levels in the airway of patients with eosinophilic bronchitis. *Allergy*. 2008;63:58-66.

■ Manuscript received June 17, 2008; accepted for publication July 8, 2008.

**Pilar Barranco**

Hospital Universitario La Paz,  
Servicio de Alergia  
P  Castellana, 261  
28046 Madrid

E-mail: pbarranco.hulp@salud.madrid.org

## ERRATUM:

"Study of Hypersensitivity Reactions and Anaphylaxis During Anesthesia in Spain"

T Lobera, MT Audicana, MD Pozo, A Blasco, E Fernández, P Ca ada, G Gastaminza, I Martínez-Albelda, I González-Mahave, D Muñoz

*J Invest Allergol Clin Immunol* 2008; 18(5): 350-356

The title of Table 1 on page 351 should read "Drugs, Substances, and Concentrations Used in the Skin Test" and not "Patient Characteristics" as printed.



## Changes in Sputum Eicosanoids and Inflammatory Markers After Inhalation Challenges With Occupational Agents

Mar Fernández-Nieto, MD; Beatriz Sastre, BS; Joaquín Sastre, MD, PhD, FCCP;  
Carlos Lahoz, MD, PhD; Santiago Quirce, MD, PhD; Mauro Madero, MD;  
and Victoria del Pozo, PhD

**Background:** An increase in cysteinyl-leukotrienes (LTs) after specific inhalation challenge (SIC) with common allergens in patients with atopic asthma has been shown previously, but there are scarce data with occupational agents. We sought to determine whether there are differences in lower airway inflammatory markers and the production of cytokines and eicosanoids between patients with a positive or negative SIC response to occupational agents.

**Methods:** Twenty-six patients with suspected occupational asthma and 13 healthy control subjects were studied. Spirometry, methacholine challenge, and sputum induction were performed at baseline and 24 h after SIC with occupational agents. Several cytokines and inflammatory mediators, including eicosanoids, were measured in sputum.

**Results:** Twenty-six SICs were carried out with high-molecular-weight or low-molecular-weight agents, and the responses were positive in 18 patients. SIC elicited nine early asthmatic responses, two dual asthmatic responses, and seven isolated late asthmatic responses. Significant increments in sputum eosinophil counts were found only in patients with positive SIC responses compared with baseline values. Interleukin-10 levels were decreased in patients with positive and negative SIC responses compared to those in healthy control subjects. A significant increase ( $p < 0.05$ ) in the LTC<sub>4</sub>/prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) ratio was observed in patients after positive SIC responses compared to those with negative SIC responses.

**Conclusions:** Overexpression of LTC<sub>4</sub>, relative underproduction of PGE<sub>2</sub>, and greater airway eosinophilia were observed in patients with positive SIC responses.

(CHEST 2009; 136:1308–1315)

**Abbreviations:** cysLT = cysteinyl-leukotriene; DTT = dithiothreitol; FITC = fluorescein isothiocyanate; HMW = high molecular weight; IFN = interferon; IL = interleukin; LMW = low molecular weight; LT = leukotriene; OA = occupational asthma; PBS = phosphate-buffered saline; PC<sub>20</sub> = provocative concentration of a substance causing a 20% fall in FEV<sub>1</sub>; PE = phycoerythrin; PGE<sub>2</sub> = prostaglandin E<sub>2</sub>; SIC = specific inhalation challenge; Th = T helper; TNF = tumor necrosis factor

Induced sputum is a useful, noninvasive tool for the diagnosis and monitoring of occupational asthma (OA).<sup>1</sup> Patients with OA show an increase in the number of eosinophils in sputum at work com-

pared with numbers on days off from work.<sup>2,3</sup> Moreover, a significant increase in eosinophil counts in sputum following specific inhalation challenge (SIC) has been observed in patients with OA caused by high-molecular-weight (HMW) and low-molecular-

Manuscript received January 13, 2009; revision accepted May 10, 2009.

**Affiliations:** From the Allergy Department (Drs. Fernández-Nieto, J. Sastre, and Madero) and Immunology Department (Drs. Lahoz and del Pozo, and Ms. B. Sastre), Fundación Jiménez Díaz Cáprio and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Madrid, Spain; and the Allergy Department (Dr. Quirce), Hospital Universitario La Paz and CIBERES, Madrid, Spain.

**Funding/Support:** This study was supported by Red Respira C03/011, CIBERES, and Sociedad Española de Alergia e Inmu-

nología Clínica (SEAIC), and by fellowship grants to Dr. Madero from the Conchita Rábago Foundation.

**Correspondence to:** Joaquín Sastre, MD, PhD, FCCP, Allergy Department, Fundación Jiménez Díaz, Av Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain; e-mail: jsastre@fdj.es

© 2009 American College of Chest Physicians. Reproduction of this article is prohibited without written permission from the American College of Chest Physicians ([www.chestjournal.org/site/misc/reprints.xhtml](http://www.chestjournal.org/site/misc/reprints.xhtml)).

DOI: 10.1378/chest.09-0103

weight (LMW) agents,<sup>4–9</sup> but an increase in neutrophils also has been found,<sup>10,11</sup> especially after exposure to diisocyanates. The increase in sputum eosinophils has been proposed<sup>1–5</sup> as a sensitive marker of the bronchial response to occupational agents.

In the airway inflammatory process of OA, eosinophilia is associated with an increased number of T cells, especially lymphocyte subsets (CD4+/CD8+), which exhibit signs of activation.<sup>12,13</sup> It has been suggested<sup>14</sup> that CD8+ cells also are key in OA, with an IgE-independent mechanism.

Hallstrand et al<sup>15</sup> reported an increase in the leukotriene (LT) C<sub>4</sub>/prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) ratio in sputum in response to exercise challenge in patients with asthma. In patients with isocyanate-induced asthma, Lemiere et al<sup>16</sup> found an increase in sputum LTB<sub>4</sub> and interleukin (IL)-8 after exposure to isocyanates compared with baseline levels, whereas no increase was found in LTC<sub>4</sub>. In this study, we assessed changes in the LTC<sub>4</sub> and PGE<sub>2</sub> concentrations in induced sputum before and after SIC with occupational agents in a group of patients with suspected OA induced by HMW or LMW agents as well as changes in sputum cell counts and cytokine expression.

## MATERIALS AND METHODS

### Subjects

Twenty-six patients with suspected OA caused by HMW or LMW occupational agents and 13 healthy control subjects were enrolled in the study. All subjects were recruited from the Fundación Jimenez Díaz Allergy Clinic (Madrid, Spain). The subjects' clinical characteristics are shown in Table 1.

### Study Protocol

On the first day (control day), a full medical and occupational history was completed. For patients who were receiving therapy with inhaled corticosteroids (*n* = 26), the drugs were withdrawn for at least 1 week before sputum induction. No patient was receiving LT modifiers or nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Spirometry and methacholine challenge were performed as described elsewhere.<sup>17</sup> These tests, together with sputum induction, were performed at baseline and 24 h after SIC with occupational agents. This study was approved by our Institutional Clinical Trials and Ethics Committee, and all subjects gave written informed consent to participate in the study.

### SICs

SIC with LMW agents was performed as previously described.<sup>7,18</sup> SIC with HMW agents was carried out following the tidal breathing inhalation method as previously described.<sup>19</sup>

### Sputum Induction and Processing

Sputum was induced with inhalations of increasing concentrations (3%, 4%, and 5%) of hypertonic saline solution,<sup>20</sup> and was

**Table 1—Clinical Characteristics of Subjects**

Characteristics	Healthy Control Subjects (n = 13)	Patients With Negative SIC Responses (n = 8)	Patients With Positive SIC Responses (n = 18)
Age, yr	24 (21–43)	42 (21–57)	32.5 (18–52)
Male gender	5 (45.5)	4 (50)	12 (66.6)
Atopy	0	3 (37.5)	13 (72.2)
Duration of symptoms, yr	0	0.75 (0.1–5)	2 (0.5–10)
Smoking history, %			
Current	0	0	11.1
Ex-smoker	0	37.5	16.6
Nonsmoker	100	62.5	72.2
FEV <sub>1</sub> , % predicted	104 (98–130)	98.5 (87.1–128)	97 (41–119)
FEV <sub>1</sub> /FVC ratio, %	86 (82–91)	83 (71.4–85)	80.7 (64.9–90)
PC <sub>20</sub>	ND	10.05†	3.10†
methacholine, mg/mL*			

Values are presented as the median (range) or No. (%), unless otherwise indicated. ND = not done.

\*PC<sub>20</sub> > 16 mg/mL.

†Geometric mean.

processed and examined for nonsquamous cell counts, as previously described,<sup>21</sup> and following European Respiratory Society<sup>22</sup> recommendations. Solid sputum material was selected from saliva, divided, and processed within 2 h by two parallel procedures. The protocol used was previously described<sup>23</sup> and slightly modified. Sputum was treated with a 0.1% dithiothreitol (DTT) solution to improve cell dispersion. Sputum was treated with a similar volume of DTT and incubated on a shaker at 37° C for 15 min. To prevent the effect of DTT on the cell suspension, an equal volume of Dulbecco phosphate-buffered saline (PBS) solution was added. Mucus was then removed by means of filtration through a 100-μm-pore nylon mesh, and the filtrate was centrifuged at 400g for 10 min to sediment any cells present. The supernatant was aliquoted and stored at –80°C until analysis. The pellet was resuspended in a PBS solution, bovine serum albumin, and ethylenediaminetetraacetic acid wash. The total cell count, viability, and percentage of squamous cells were determined by trypan blue exclusion staining. The pellet was adjusted for 1 × 10<sup>6</sup> cells/mL with a PBS solution containing 2% fetal calf serum for flow cytometry. The rest of the cell suspension was resuspended (TRIZol; Invitrogen; Carlsbad, CA) and stored at –80°C until used.

### Flow Cytometry of Sputum Cells

For each test, 100 μL of sputum cell suspension was incubated with 3 μL of each monoclonal antibody (BD Biosciences; San Jose, CA) for 30 min at 4°C in the dark. Cells were washed with PBS solution containing 2% fetal calf serum and resuspended in 400 μL of PBS solution containing 2% fetal calf serum. Subsequently, the cells were identified with a two-laser, five-parameter flow cytometer (FACSCalibur; BD Biosciences) and analyzed using computer software (Cell Quest; BD Biosciences). Typically, 10,000 to 50,000 total cells were collected and analyzed per sample. All sputum cell samples were stained with phycoerythrin

(PE)-C/5-conjugated antihuman CD45 monoclonal antibody to exclude all nonleukocyte cells in each test. The panel consisted of CCR3 fluorescein isothiocyanate (FITC)/CD16 PE, CCR3 FITC/DR PE, CD69 FITC/CD16 PE, CD14 FITC/DR PE, CD4 FITC/CD2 PE, CD4 FITC/CD25 PE, CD19 FITC/CD2 PE, CD34 FITC/CDw125 PE, CD63 FITC/IgE PE, and isotype control (BD Biosciences), which were used to establish background fluorescence for each fluorochrome.

#### Measurement of Soluble Mediators, Cytokines, and Eicosanoids

We analyzed IL-5, IL-10, IL-1, IL-8, interferon (IFN)- $\gamma$ , and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  by enzyme-linked immunosorbent assay (or ELISA) kits (Bender MedSystems GmbH; Vienna Austria). The detection limit of these assays was between 0.99 and pg/ml (1.45, 0.99, 1.06, 5, 0.99, and 3.83 pg/mL, respectively). All these assays have different coefficient of variations for intraassay (6.6%, 3.2%, 5.4%, 4.1%, 4.5%, and 6.9%, respectively) and interassay (6.8%, 5.6%, < 10%, 10.9%, 5.7%, and 7.4%, respectively). Moreover, we tested two types of lipidic mediators, PGE<sub>2</sub> and LTC<sub>4</sub>, by enzyme-linked immunosorbent assay (Cayman Chemical Company; Ann Arbor, MI). Previously, to test lipid mediators, sputa were treated to remove protein and other contaminants that could interfere with the assay. In all subjects, mediators were measured in neat supernatants in duplicate. PGE<sub>2</sub> assay shows a detection limit of 2 pg/mL, with a coefficient of variation for intraassay values of 5% and a coefficient of variation for interassay values of 4%, with a specificity of 100%. The LTC<sub>4</sub> assay has a detection limit of 13 pg/mL, a specificity of 100%, and a coefficient of variation for intraassay values and interassay values of 8% and 10%, respectively.

We developed several experiments to analyze a possible effect of DTT in these kinds of experiments. We observed that this factor does not exercise any effect in the evaluation of lipid mediators. This conclusion has been observed by others.<sup>24,25</sup>

#### Statistical Analysis

Subject characteristics were described with descriptive statistics and expressed as means and SDs. All measures were performed in a blinded fashion. Comparisons of mediator concentration and sputum-different cell counts across the three groups and between the groups were performed with Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney *U* test, and analysis of variance and unpaired *t* test with Welch correction for nonparametric data and parametric data, respectively. Normality was analyzed with the Kolmogorov-Smirnov test. A difference was considered to be significant when *p* was  $\leq 0.05$ . Statistical analyses were performed with a statistical software package (GraphPad InStat3; GraphPad Software Inc; San Diego, CA).

## RESULTS

### SICs

Twenty-six SICs were carried out and elicited nine early asthmatic responses, two dual asthmatic responses, and seven isolated late asthmatic responses. The implicated occupational agents were LMW agents, including isocyanates (*n* = 7), eugenol (*n* = 1), formaldehyde (*n* = 1), and HMW agents, including latex (*n* = 3), tampico fiber (*n* = 1), wheat flour (*n* = 3),

fungal  $\alpha$ -amylase (*n* = 1), and esparto grass fiber (*n* = 1). The eight subjects with negative SIC responses were exposed to LMW agents, including isocyanates (*n* = 1), formaldehyde (*n* = 1), styrene (*n* = 1), cutting mineral oil (*n* = 1), wood (*n* = 1), and glutaraldehyde (*n* = 1), and an HMW agent, latex (*n* = 2).

All patients with positive SIC responses but one had a positive methacholine test result at baseline, and seven patients had a twofold or greater increase in provocative concentration of a substance (methacholine) causing a 20% fall in FEV<sub>1</sub> (PC<sub>20</sub>) that was observed 24 h after SIC. In five patients with negative SIC responses, methacholine PC<sub>20</sub> was > 16 mg/mL, and none changed after SIC.

### Differential Sputum Cell Counts

Fifty-two sputum samples from patients with positive and negative SIC responses and healthy control subjects were analyzed. Sputum samples had < 10% squamous epithelial cells and > 85% cell viability (Table 2).

Macrophage counts showed differences between a control group (55.17%) and the other groups (negative SIC responses, 17.52%; positive SIC responses, 28.7% at baseline and 32.27% post-SIC; *p* < 0.05). In the case of neutrophils, patients with positive SIC responses both at baseline and post-SIC showed a significantly higher percentage than healthy control subjects (63.37% and 62.15% vs 38.34%, respectively; *p* < 0.01 and *p* < 0.05, respectively); the percentage of this cellular type in patients with negative SIC responses was similar to that in healthy control subjects. Figure 1B shows the individual variations in the percentage of neutrophils after SIC.

Induced sputum eosinophil percentages were significantly higher (*p* < 0.05) in all patients with suspected OA (patients with negative and positive SIC responses) than in the healthy control subjects (Table 2). Moreover, eosinophils significantly increased in patients after positive SIC responses compared to baseline levels (median, 3.19% and 4.15%, respectively; *p* < 0.05) [Fig 1A, Table 2]. The statistical analyses were repeated, excluding the two patients who were smokers, and the results did not change.

In two patients with negative SIC responses, an increase in sputum eosinophils (9.92% and 8.25%) was observed after challenge. One of them had a negative methacholine test result before and after challenge with styrene. Thus, this patient was given a diagnosis of occupational eosinophilic bronchitis. Moreover, the baseline PGE<sub>2</sub> level in sputum for this patient was 17 pg/mL, and after the challenge it increased to 201 pg/mL, which is in keeping with our previous results<sup>26</sup> in patients with eosinophilic bronchitis. In the other patient, the methacholine test was

**Table 2—Total and Differential Cell Counts in Induced Sputum (Flow Cytometry)**

Induced Sputum	Healthy Control Subjects (n = 13)	Negative SIC Responses		Positive SIC Responses	
		Baseline (n = 8)	24-h (n = 8)	Baseline (n = 18)	24-h (n = 18)
Total cells, 10 <sup>6</sup>	3.24 (0.66–30.4)	1.38 (0.26–5.44)†	2.31 (0.6–16.5)	1.75 (0.28–13.32)	2.05 (0.36–14.28)
Viable cells, %	86.44 (74.03–92.11)	84.47 (66–94.4)	84.42 (63–91.92)	84.56 (68–95.2)	84.86 (65–95.9)
Squamous cells, %	9.6 (3.77–42.86)	3.18 (0–39)	6.74 (1.06–31)	4.3 (1.19–27)*	9.28 (1.75–32)
Macrophages, %	55.17 (9.91–81.69)	44.2 (3.78–72.08)	17.52 (6.66–65.47)*	28.7 (0–62.97)*	32.27 (0–71.86)*
Neutrophils, %	38.34 (8.51–84.71)	38.14 (16.71–94.25)	51.04 (21.82–84.72)	63.37 (27.56–89.26)†	62.15 (25.09–85.55)*
Eosinophils, %	1.93 (0.13–5.11)	5.86 (0.43–13.37)	10.14 (1.65–15.11)*	3.19 (0.11–19.65)‡	4.15 (0.13–24.11)*
Lymphocytes, %	2.29 (0.1–16.18)	0.84 (0.2–7.15)	0.79 (0.21–3.09)*	0.82 (0.02–8.48)	0.91 (0.26–5.42)
Eosinophilic precursors	0.092 (0–0.76)	0 (0–0.46)	0 (0–0.34)	0.03 (0–6.33)	0.09 (0–0.62)
Activated basophils	0.92 (0–9.64)	0.32 (0–1.34)	0.69 (0.05–6.86)	0.6 (0–19.75)	0.28 (0–14.65)

Results are expressed as the median (range).

\*p < 0.05 compared with healthy control subjects.

†p < 0.01 compared with healthy control subjects.

‡p < 0.05 compared with OA after SIC.

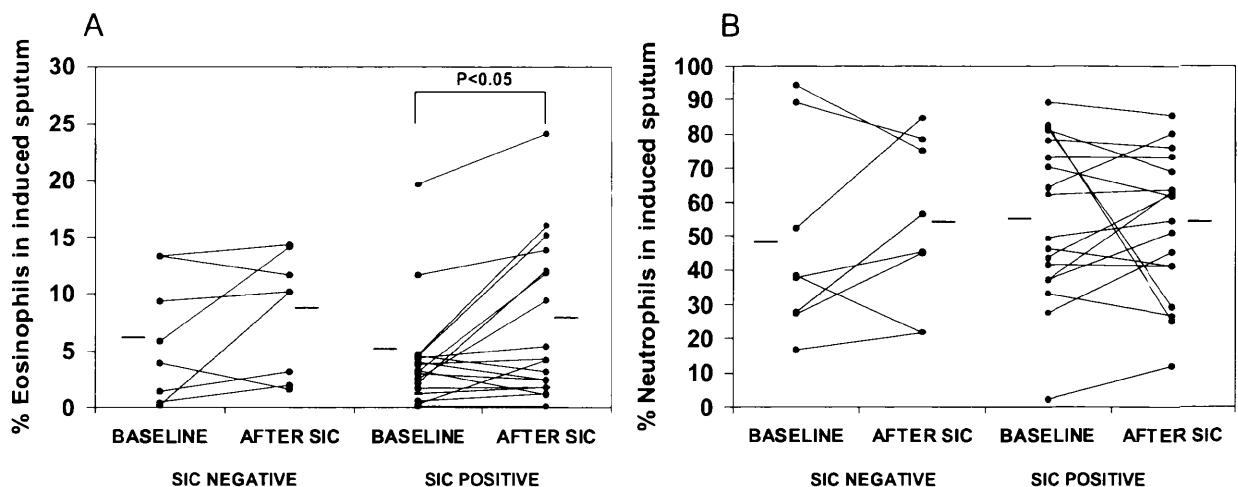
positive and did not change after SIC with pine wood (PC<sub>20</sub>, 5.5 vs 3.3 mg/mL, respectively). Because the methacholine test result was positive, the patient could not be given a diagnosis of eosinophilic bronchitis, and because no asthmatic response was observed, he could not be given a diagnosis of OA due to pine wood. An increase in sputum eosinophils after SIC in patients who did not respond to SIC has been reported previously,<sup>27</sup> and its clinical relevance is uncertain.

#### Cytokine Levels in Induced Sputum Supernatant From Patients With and Without OA and Healthy Control Subjects

We assessed the following cytokine levels: IL-5, IL-10, and IFN- $\gamma$ , and representatives of T helper (Th) type 2 and Th1 cytokines. Moreover, we mea-

sured proinflammatory cytokines such as IL-1, IL-8, and TNF- $\alpha$ . The results indicated that IL-5 levels were increased in the patients with positive SIC responses (at baseline and 24 h after SIC) compared with those seen in healthy control subjects (p < 0.01) [Fig 2].

With respect to the production of regulatory cytokines by sputum cells, IL-10 concentrations were significantly lower in induced sputum samples from patients with suspected OA (with either positive or negative SIC responses) compared with healthy control subjects (Fig 2) [p < 0.05]. Levels were very similar before and after positive SIC responses, but they were more elevated in patients with negative SIC responses. Moreover, there were no significant changes in the levels of IFN- $\gamma$  between both groups with suspected OA and the control group (Fig 2).



**FIGURE 1.** A: changes in sputum eosinophils at baseline and after SIC in patients with positive and negative SIC responses. B: changes in sputum neutrophils at baseline and after SIC in patients with positive and negative SIC responses.

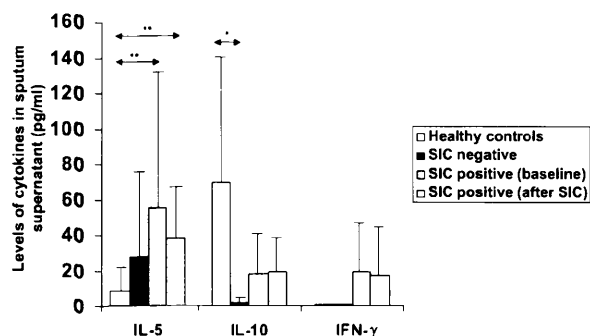


FIGURE 2. Sputum fluid-phase measurement of cytokines from healthy control subjects and patients with negative and positive SIC responses. Levels of IL-5, IL-10, and IFN- $\gamma$  in sputum from different groups of subjects were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. Significant differences in IL-5 (\*\* =  $p < .01$ ) levels were obtained for patients with positive SIC responses vs healthy control subjects. Additionally, lower IL-10 levels were detected in patients with negative SIC and positive SIC responses with respect to healthy control subjects (\* =  $p < 0.05$ ).

Otherwise, analysis of the expression of several cytokines in the study groups showed that IL-5 is the predominant mediator in the local inflammatory process in the airways, with a Th2 cytokine profile in both diseases.

We observed that IL-1 and TNF- $\alpha$  had a similar profile, although statistically significant changes were not identical. IL-1 levels were significantly lower in patients with negative SIC responses than in those 24 h after positive SIC response and healthy control subjects (7.86 pg/mL vs 26.11 and 34.11 pg/mL, respectively;  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ ). TNF- $\alpha$  levels were significantly higher in healthy control subjects than in patients with suspected OA (positive and negative SIC responses) at baseline (30.51 pg/mL vs 3.83 and 17.63 pg/mL, respectively;  $p < 0.05$ ) [Fig 3, *top*].

IL-8 concentration was significantly elevated in patients with positive SIC responses compared with patients with negative SIC responses (526.64 and 383.39 pg/mL, respectively;  $p < 0.05$ ) under baseline conditions. In patients with positive SIC responses, IL-8 concentration 24 h after challenge (129.9 pg/mL) was significantly higher than in those with negative SIC responses at baseline ( $p < 0.05$ ) [Fig 3, *bottom*] but not in patients with positive SIC responses at baseline.

#### Eicosanoids in Induced Sputum Supernatant

An inverse relationship was observed between PGE<sub>2</sub> and LTC<sub>4</sub> concentrations in patients with positive SIC and negative SIC responses. Thus, the LTC<sub>4</sub>/PGE<sub>2</sub> ratio in induced sputum supernatant was significantly increased in patients with positive

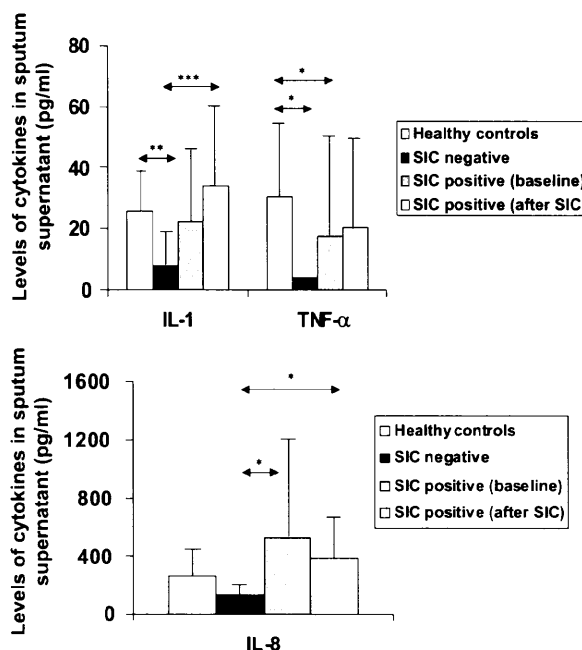


FIGURE 3. Inflammatory cytokine levels in induced sputum supernatants. *Top*: a comparison of IL-1 and TNF- $\alpha$  levels in induced sputum supernatants among the study groups. *Bottom*: a comparison of IL-8 levels among the study groups in induced sputum supernatants. Sputum from patients with negative SIC responses had lower levels than healthy control subjects and patients with positive SIC responses. \* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; and \*\*\* =  $p < 0.001$ .

SIC responses 24 h after challenge compared with patients with negative SIC responses, the difference being more than twofold ( $p < 0.05$ ) [Fig 4]. There were no intergroup differences in sputum cells count, cytokines, or eicosanoid measurements in patients with positive SIC responses when they were subdivided by either the causative agent

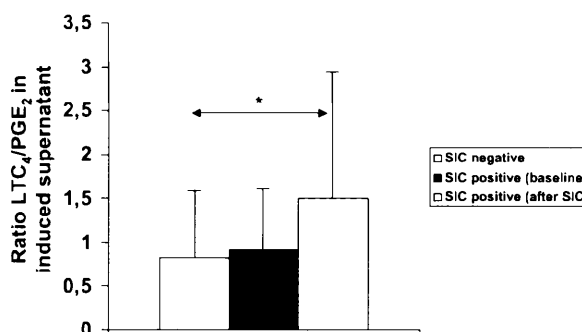


FIGURE 4. LTC<sub>4</sub>/PGE<sub>2</sub> ratio in induced sputum from healthy control subjects and patients with negative and positive SIC responses. Data are represented as the geometric mean  $\pm$  SD. Patients with a positive SIC response had a significantly higher LTC<sub>4</sub>/PGE<sub>2</sub> ratio than patients with a negative SIC response.

(HMW or LMW agent) or the type of asthmatic reaction (immediate or late).

## DISCUSSION

We observed several changes in sputum inflammatory markers and eicosanoids after inhalation challenges with occupational agents. An increase in inflammatory parameters associated with eosinophilic infiltration (sputum eosinophils and IL-5) was found, which was in keeping with the results observed by other authors<sup>4,5</sup> of sputum cells before and after SIC with occupational agents. In the majority of cases of OA, the percentage of sputum eosinophils increased after exposure to occupational agents in the laboratory or at the workplace compared with baseline, but an increase in sputum neutrophils also has been observed. In agreement with this finding, we observed a significant increase in IL-8 concentration but not in neutrophils in patients with positive SIC responses compared with patients with negative SIC responses. Lemiere et al<sup>4</sup> documented increases in both eosinophils and neutrophils in sputum after asthmatic reactions induced by HMW and LMW agents, and these cellular changes occurred independently from the temporal pattern of asthmatic reactions. Di Franco et al<sup>28</sup> found more neutrophils and fewer eosinophils in the sputum of patients with OA caused by LMW agents than in that of patients with HMW agent-induced OA or non-OA. These findings indicate that neutrophils are involved in OA, perhaps more frequently but not exclusively, when OA is provoked by LMW agents. Therefore, OA may be subdivided into eosinophilic or neutrophilic asthma phenotypes.<sup>29</sup>

The use of sputum cell counts has been shown to be useful in the investigation of OA, and performing flow cytometry on sputum cell counts may allow the identification of cell populations that otherwise might not be identified, which is especially important for basophils. In a previous case report,<sup>7</sup> we demonstrated a small increase in sputum eosinophils but a large increase in activated basophils 24 h after exposure to styrene along with functional changes supporting the diagnosis of OA due to styrene. An increase in basophil counts in induced sputum has been found<sup>30,31</sup> in patients with atopic asthma and in patients with OA after SIC. In this study, we did not observe significant changes in the number of activated basophils in the whole group after positive SIC response, but there was an important increase (4.85-fold) in activated basophils in six patients after positive SIC response.

Classically, allergic asthma and rhinitis are described as associated with a Th2 activation. However,

recent work has indicated that Th1 activation also can be associated with these diseases due to a defect in regulatory T-cell activation. OA and occupational rhinitis are peculiar cases of these diseases in which the T-cell activation profile is unclear. Previous studies<sup>32,33</sup> in mice have demonstrated a Th2 cell activation, with an increase in IL-5 and IL-4 production in experimental OA. Other mouse studies have found a Th1 activation associated with the Th2 activation previously described.<sup>13,34</sup> In addition, in non-OA, some evidence<sup>35</sup> indicates that Th1 and Th2 cell activation could be concomitantly associated with a decrease in the regulatory T-cell frequency and activation, and it has been described<sup>36</sup> that in patients with OA and occupational rhinitis the proportion of peripheral regulatory T cells decrease after SIC. In our study, analysis of the expression of several cytokines showed that IL-5 (a Th2 cytokine) is the predominant mediator in the local inflammatory process in the airways, with a Th2 cytokine profile in the patients with suspected OA studied. We observed that IL-1 levels were significantly lower in patients with negative SIC responses than in patients with positive SIC responses and healthy control subjects. By contrast, TNF- $\alpha$  levels were significantly higher in healthy control subjects than in patients with negative SIC responses and patients with positive SIC responses at baseline.

To date, controversial data about the cytokines involved in OA in response to SIC have been published. *In vitro* experiments have reported that peripheral blood mononuclear cells of workers with diisocyanate-induced OA demonstrated a hapten-specific production of histamine-releasing factor<sup>37</sup> and the release of monocyte chemoattractant protein-1, IL-8, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$ .<sup>14</sup> Interestingly, in our study, IL-10 levels were decreased in patients with asthma with suspected OA with either negative or positive SIC responses. IL-10 is a cytokine with broad anti-inflammatory properties, and it has been shown<sup>38,39</sup> to play an important role in the regulation of Th2 cell responses. Therefore, IL-10 is a potent anti-inflammatory cytokine that inhibits various types of inflammatory disorders. In this regard, IL-10 produced by either Th1 or Th2 cells may be an important feedback regulator controlling the damage associated with an exaggerated inflammatory response. It is likely that constitutive production of IL-10, as occurs in the lungs of healthy persons, contributes to maintaining a balance that inhibits inflammation. Conversely, decreased or absent IL-10, as occurs in OA, may contribute to a regulatory imbalance in which inflammatory responses could become pathologic. Asthma and fatal ARDS also



have been associated with decreased IL-10 production,<sup>40,41</sup> suggesting the importance of this cytokine in human lung diseases.

Another important issue in the immunopathology of OA is the relationship between sputum PGE<sub>2</sub> and LTC<sub>4</sub> before and after SIC. In our study, the LTC<sub>4</sub>/PGE<sub>2</sub> ratio in induced sputum supernatant was significantly increased in patients with positive SIC responses 24 h after the challenge compared with patients with negative SIC responses. The cyclooxygenase product PGE<sub>2</sub> is produced by several cells in human airways, including epithelium<sup>42</sup> and smooth muscle<sup>43</sup>; it has inhibitory effects on inflammatory cells and bronchoprotective effects in patients with bronchial asthma. PGE<sub>2</sub> has been shown to protect against exercise-induced bronchoconstriction,<sup>44</sup> allergen-induced bronchoconstriction,<sup>45</sup> and aspirin-induced bronchoconstriction,<sup>46</sup> as well as against bronchoconstrictor agents such as methacholine and histamine.<sup>47</sup> We recently have shown<sup>26</sup> that sputum PGE<sub>2</sub> concentration is significantly higher, and LTC<sub>4</sub>/PGE<sub>2</sub> ratio is lower in patients with nonasthmatic eosinophilic bronchitis than in patients with asthma and control subjects. One of the patients with a negative SIC response fulfilled the criteria of occupational eosinophilic bronchitis induced by styrene. Moreover, the patient showed a 10-fold increase in sputum PGE<sub>2</sub> concentration after challenge, which is in agreement with our previous investigations.<sup>26</sup> The dysregulated synthesis of bronchoconstrictor (LTC<sub>4</sub>) and bronchoprotective (PGE<sub>2</sub>) eicosanoids may explain the abnormal airway function found in asthma.

There are scarce data in the literature on this issue. Similar results have been reported by Macfarlane et al<sup>25</sup> that demonstrated an increase in cysteinyl-LTs (cysLTs) but not in the prostanoids PGD<sub>2</sub> and PGE<sub>2</sub> associated with a late asthmatic reaction after allergen challenge in patients with atopic asthma and that have been described<sup>15</sup> in patients with exercise-induced bronchoconstriction. In contrast, Lemiere et al<sup>16</sup> showed a significant increase in cysLT1 and BLT1 receptor expression as well as a release of LTB<sub>4</sub> and IL-8 after exposure to isocyanates compared with the baseline only in patients with isocyanate-induced asthma, but their data showed no increase in LTC<sub>4</sub>.

The alteration in the cysLTs/PGE<sub>2</sub> ratio identified in the present study may be indicative of airway epithelial injury. Taken together, these data suggest that the relative underproduction of PGE<sub>2</sub> and overproduction of cysLTs also may be important factors in the bronchoconstrictive response induced by occupational agents. In conclusion, we have demonstrated for the first time, to our knowledge, that the LTC<sub>4</sub>/PGE<sub>2</sub> ratio in induced sputum is increased

in patients after positive SIC responses to occupational agents compared with patients with negative SIC responses.

#### ACKNOWLEDGMENTS

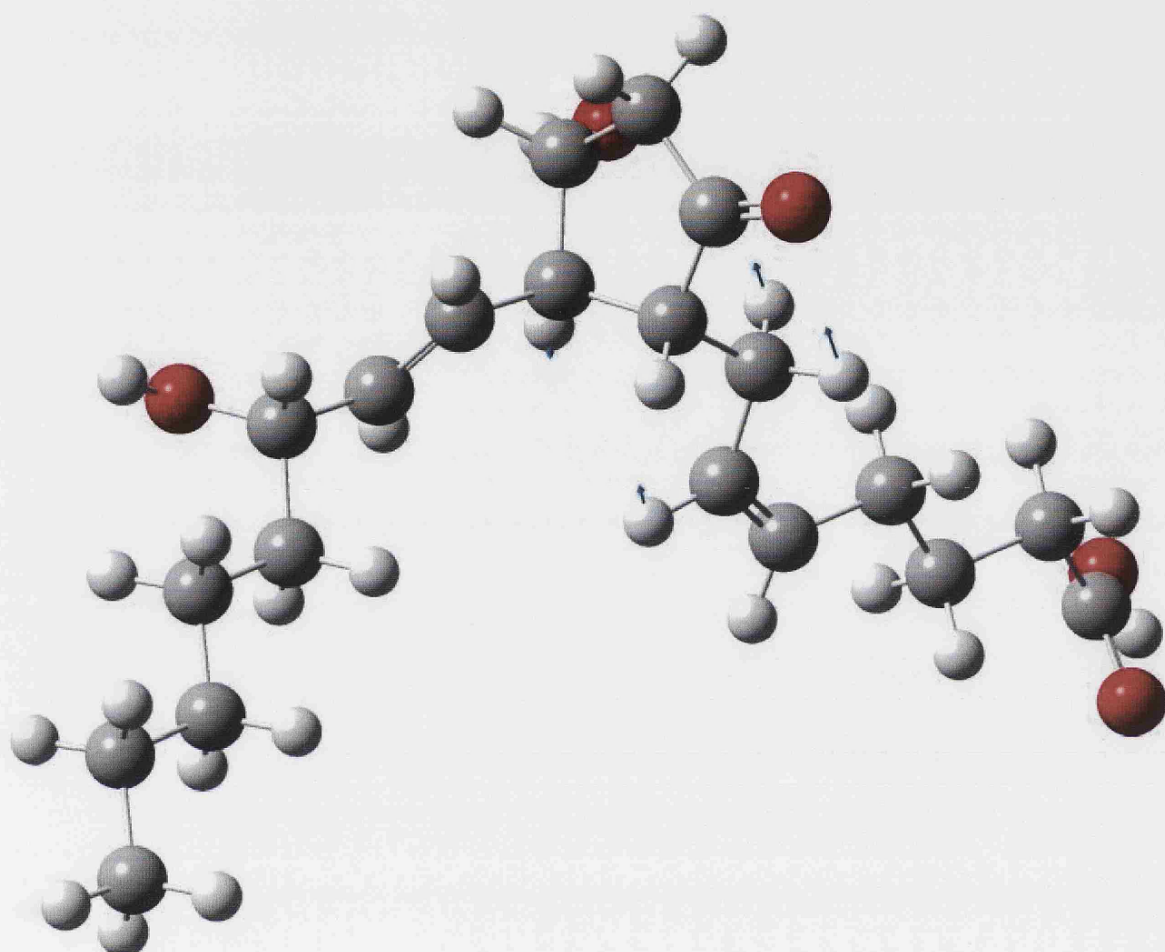
**Author contributions:** Drs. Fernández-Nieto, J. Sastre, Quirce, and Madero participated in the selection of patients and clinical studies. Drs. Lahoz and del Pozo, and Ms. B. Sastre performed all laboratory work.

**Financial/nonfinancial disclosures:** Dr. J. Sastre reports having served as a consultant to Phadia, Schering-Plough, and GlaxoSmithKline; having been paid lecture fees by Novartis, GlaxoSmithKline, Stallergenes, and UCB; and having received grant support from Phadia, GlaxoSmithKline, and ALK-Abelló. Drs. Fernández-Nieto, Lahoz, Quirce, Madero, and del Pozo, and Ms. B. Sastre have reported to the ACCP that no significant conflicts of interest exist with any companies/organizations whose products or services may be discussed in this article.

#### REFERENCES

- 1 Lemiere C. Induced sputum and exhaled nitric oxide as noninvasive markers of airway inflammation from work exposures. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007; 7:133–137
- 2 Lemiere C. The use of sputum eosinophils in the evaluation of occupational asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; 4:81–85
- 3 Girard F, Chabouille S, Cartier A, et al. An effective strategy for diagnosing occupational asthma: use of induced sputum. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170:845–850
- 4 Lemiere C, Chabouille S, Trudeau C, et al. Characterization of airway inflammation after repeated exposures to occupational agents. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106:1163–1170
- 5 Lemiere C, Chabouille S, Malo J-L, et al. Changes in sputum cell counts after exposure to occupational agents: what do they mean? *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107:1063–1068
- 6 Moscato G, Pignatti P, Yacoub MR, et al. Occupational asthma and occupational rhinitis in hairdressers. *Chest* 2005; 128:3590–3598
- 7 Fernández-Nieto M, Quirce S, Fraj J, et al. Airway inflammation in occupational asthma caused by styrene. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:948–950
- 8 Quirce S, Fernández-Nieto M, del Pozo V, et al. Occupational asthma and rhinitis caused by eugenol in a hairdresser. *Allergy* 2008; 63:137–138
- 9 Quirce S, Fernández-Nieto M, Pastor C, et al. Occupational asthma due to tampico fiber from agave leaves. *Allergy* 2008; 63:943–945
- 10 Park H, Jung K, Kim HY, et al. Neutrophil activation following TDI bronchial challenges to the airway secretion from subjects with TDI-induced asthma. *Clin Exp Allergy* 1999; 29:1395–1401
- 11 Lemiere C, Romeo P, Chabouille S, et al. Airway inflammation and functional changes after exposure to different concentrations of isocyanates. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110:641–646
- 12 Mapp CE, Satta M, Maestrelli P, et al. Mechanisms and pathology of occupational asthma. *Eur Respir J* 1994; 7:544–554
- 13 Lummus ZL, Alam R, Bernstein JA, et al. Diisocyanate antigen-enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1, IL-8, and tumor necrosis factor- $\alpha$  by peripheral mononuclear cells of workers with occupational asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102:265–274

- 14 Maestrelli P, Del Prete GF, De Carli M, et al. CD8 T-cell clones producing interleukin-5 and interferon- $\gamma$  in bronchial mucosa of patients with asthma induced by toluene diisocyanate. *Scand J Work Environ Health* 1994; 20:376–381
- 15 Hallstrand TS, Chi EY, Singer AG, et al. Secreted phospholipase A2 group X overexpression in asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176:1072–1078
- 16 Lemiere C, Pelissier S, Tremblay C, et al. Leukotrienes and isocyanate-induced asthma: a pilot study. *Clin Exp Allergy* 2004; 34:1684–1689
- 17 Quirce S, Marañón F, Umpiérrez A, et al. Chicken serum albumin (Gal d 5\*) is a partially heat-labile inhalant and food allergen implicated in the bird-egg syndrome. *Allergy* 2001; 56:754–762
- 18 Sastre J, Fernández-Nieto M, Novalbos A, et al. Need for monitoring nonspecific bronchial hyperresponsiveness before and after isocyanate inhalation challenge. *Chest* 2003; 123:1276–1279
- 19 Quirce S, Fernández-Nieto M, Escudero C, et al. Bronchial responsiveness to bakery-derived allergens is strongly dependent on specific skin sensitivity. *Allergy* 2006; 61:1202–1208
- 20 Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, et al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 1992; 47:25–29
- 21 Pizzichini E, Pizzichini MMM, Efthimiadis A, et al. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:308–317
- 22 Efthimiadis A, Spanevello A, Hamid Q, et al. Methods of sputum processing for cell counts, immunocytochemistry and in situ hybridisation. *Eur Respir J* 2002; 20(suppl 37):19s–23s
- 23 Hadjicharalambous C, Dent G, May RD, et al. Measurement of eotaxin (CCL11) in induced sputum supernatants: validation and detection in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:657–662
- 24 Pavord ID, Ward R, Woltmann G, et al. Induced sputum eicosanoid concentrations in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:1905–1909
- 25 Macfarlane AJ, Dworski R, Sheller JR, et al. Sputum cysteinyl leukotrienes increase 24 h after allergen inhalation in atopic asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1553–1558
- 26 Sastre B, Fernández-Nieto M, Mollá R, et al. Increased prostaglandin E2 levels in the airway of patients with eosinophilic bronchitis. *Allergy* 2008; 63:58–66
- 27 Obata H, Dittrick M, Chan H, et al. Sputum eosinophils and exhaled nitric oxide during late asthmatic reaction in patients with western red cedar asthma. *Eur Respir J* 1999; 13:489–495
- 28 Di Franco A, Vagaggini B, Bacci E, et al. Leukocyte counts in hypertonic saline-induced sputum in subjects with occupational asthma. *Respir Med* 1998; 92:550–557
- 29 Wanzel SE. Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *Lancet* 2006; 368:804–813
- 30 Gauvreau GM, Lee JM, Watson RM, et al. Increased numbers of both airway basophils and mast cells in sputum after allergen inhalation challenge of atopic asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1473–1478
- 31 Krakowiak A, Krawczyk-Adamus P, Dudek W, et al. Changes in cellular and biochemical profiles of induced sputum after allergen-induced asthmatic response: method for studying occupational allergic airway inflammation. *Int J Occup Med Environ Health* 2005; 18:27–33
- 32 Maestrelli P, Occari P, Turato G, et al. Expression of interleukin (IL)-4 and IL-5 proteins in asthma induced by toluene diisocyanate (TDI). *Clin Exp Allergy* 1997; 27:1291–1298
- 33 Hardy CL, Kenins L, Drew AC, et al. Characterization of a mouse model of allergy to a major occupational latex glove allergen Hev b 5. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167:1393–1399
- 34 Herrick CA, Xu L, Wisnewski AV, et al. A novel mouse model of diisocyanate-induced asthma showing allergic-type inflammation in the lung after inhaled antigen challenge. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109:873–878
- 35 Karagiannidis C, Akdis M, Holopainen P, et al. Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:1425–1433
- 36 Mamessier E, Milhe F, Guillot C, et al. T-cell activation in occupational asthma and rhinitis. *Allergy* 2007; 62:162–169
- 37 Herd ZL, Bernstein DI. Antigen-specific stimulation of histamine releasing factors in diisocyanate-induced occupational asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150:988–994
- 38 Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:683–765
- 39 Hawrylowicz CM. Regulatory T cells and IL-10 in allergic inflammation. *J Exp Med* 2005; 202:1459–1463
- 40 Borish L, Aarons A, Rumblyrt J, et al. Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97:1288–1296
- 41 Donnelly SC, Strieter RM, Reid PT, et al. The association between mortality rates and decreased concentrations of interleukin-10 and interleukin-1 receptor antagonist in the lung fluids of patients with the adult respiratory distress syndrome. *Ann Intern Med* 1996; 125:191–196
- 42 Churchill L, Chilton FH, Resau JH, et al. Cyclo-oxygenase metabolism of endogenous arachidonic acid by cultured human tracheal epithelial cells. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140:449–459
- 43 Delamere F, Holland E, Patel S, et al. Production of PGE2 by bovine cultured airway smooth muscle cells and its inhibition by cyclo-oxygenase inhibitors. *Br J Pharmacol* 1994; 111:983–988
- 44 Melillo E, Woolley KL, Manning PJ, et al. Effect of inhaled PGE2 on exercise-induced bronchoconstriction in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149:1138–1141
- 45 Pavord ID, Wong CS, Williams J, et al. Effect of inhaled prostaglandin E2 on allergen-induced asthma. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148:87–90
- 46 Mastalerz L, Sanak M, Gawlewicz-Mroccka A, et al. Prostaglandin E2 systemic production in patients with asthma with and without aspirin hypersensitivity. *Thorax* 2008; 63:27–34
- 47 Manning PJ, Lane CG, O'Byrne PM. The effect of oral prostaglandin E1 on airway responsiveness in asthmatic subjects. *Pulm Pharmacol* 1989; 2:121–124



## *10. Agradecimientos*



*A fecha de hoy, son ya casi siete años y medio el tiempo transcurrido desde que entré por primera vez en el Departamento de Inmunología, no sin antes haber dado un rodeo por medio hospital. Y todavía recuerdo aquel primer momento como si hubiera sido ayer. Llegado este punto resulta difícil tener las palabras adecuadas y que realmente reflejen el sincero agradecimiento que quiero transmitir a todas aquellas personas que, a lo largo de este tiempo, han formado parte (en mayor o menor grado) de mi vida, tanto a nivel laboral como personal y, por tanto, han contribuido de distinta forma a este proyecto. Esto, que parece la parte más sencilla de escribir, no lo es, en tanto que exige un esfuerzo de memoria importante, ya que han sido muchas las personas que han estado y/o están todavía ayudando de alguna manera. Por ello, ruego me disculpen si aquellos que esperaban encontrar su nombre aquí no lo hallan, pues no será porque no lo merezcan, sino por un fallo en mi memoria. Por favor, sentiros incluidos en estos agradecimientos.*

*Agradecer a la Dra. Victoria del Pozo, Vito, directora de esta tesis, todo su apoyo, ayuda y dirección constante a lo largo de este tiempo. Gracias por transmitirme tu capacidad para encontrar el lado positivo de las cosas, tu constancia y empeño para encontrar soluciones a las adversidades y por inculcarme el intentar ser cada día mejor profesional en nuestro campo. Y, por supuesto, por brindarme tu apoyo tanto en lo profesional como en lo personal.*

*Al Dr. Carlos Lahoz, la primera persona que confió en mi capacidad y me brindó la oportunidad de entrar en este maravilloso, aunque sacrificado, mundo de la ciencia y la investigación. Sin su “ven cuando termines los exámenes” no estaría ahora aquí. Gracias por abrirme la puerta e invitarme a entrar. Profesional donde los haya, sincero, directo y sobre todo buena persona.*

*Y a Gloria, ejemplo de discreción y saber estar, por su trato siempre cariñoso y, por qué no, por sus magníficas empanadas de antaño.*

*Son varias las personas que desde que comencé mi andadura han estado a mi lado. También varias las que estuvieron y se fueron. Y algunas las que estuvieron, volaron y vuelven a estar. El orden no es significativo de importancia, sólo una forma de hacer un recorrido ordenado por mi memoria.*

*A la Dra. Esther López, bueno, realmente Esther, vecina, compañera y amiga. Sin ti no estaría ahora aquí. Gracias por tus consejos y opiniones, por tu rotulado de cajones, tu orden y estructuración. Y, sobre todo, por estar ahí para lo que necesitara, siendo una amiga. Mi hermana mayor fuera de casa.*

*A la Dra. Blanca Cárdena, mi Blanche. Ejemplo de meticulosidad y perfeccionamiento, del paso por paso. Por todos esos arrebatos a última hora de la tarde llegando con preguntas insospechadas, por tu ayuda siempre que la he necesitado, por todos esos *kit kat*, tus consejos, tus frases en francés, tus alabanzas y tus críticas, tus darle vueltas a las cosas, tu generosidad. Gracias por ser como eres.*

*A la Dra. Soledad Gallardo, mi Sole. Te fuiste pero tuviste que volver. Si es que no podías dejar esto tan prontito... La inteligencia y sabiduría "enmascaradas" en un mundo de pequeños despistes y olvidos. Gracias por todos tus buenos consejos, por tu forma de entender la vida, los muchos y muy buenos momentos pasados, por contagiarme tu vitalidad y por seguir viviendo de forma apasionada todo lo que haces. No olvides nunca lo que lleva el colgante. Nos vemos pronto en las clases de salsa.*

*A la Dra. Pilar Palomino, mi Pili aunque ya hayan secundado esta moción muchos más. Profesional, sincera y cariñosa. Repleta de buenos*

*consejos y conocimientos. Como una segunda madre, estirando camisetas en verano. Gracias Pilar por toda tu ayuda a lo largo de estos años, por tu interés acerca de lo profesional y lo personal, y tu magnífico conocimiento del castellano.*

*A la Dra. Rosa García, por tu buen humor, tu forma de tomarte las cosas, por tu interés y ayuda hacia este trabajo y en lo concerniente a mi persona. Por estar dispuesta a saciar mi curiosidad sobre el VIH siempre que te he pillado por el despacho. Por esos fines de semana a veces compartidos sin quererlo.*

*A los doctores Fernando Vivanco y Rafael Bragado por tener vuestras puertas abiertas siempre que lo he necesitado. Por ese sentido del humor crítico y ese chocolate negro tan bueno.*

*A la gente del laboratorio 4 y 5, a los que están y a los que ya no. A Carlos, mi Carlitos (no Charlie), por tus conocimientos y explicaciones a nivel químico en los que a veces me he perdido, tu ayuda incondicional a cualquier hora y momento, tu cariño sincero y apoyo en todo. Por ser “mi hermano mayor” desde el primer día que llegué siendo una pipiola, por ese humor ácido, sarcástico (a esto todavía no he llegado). Pero sobre todo por ser tan, tan buena persona como eres. Por ese primer mail por tus gafas de sol y tantos buenos momentos compartidos. Cañas a última hora y conversaciones largas. Me alegra verte tan feliz ahora. Te mereces lo mejor.*

*A Fernando, Fer para la mayoría. Por tu sinceridad y carácter, tu honestidad y fuerza para seguir hacia adelante. Pronto estarás escribiendo algo así. Como Bárbara y Marina, magníficas compañeras dispuestas a echar*

*un cable. A Gloria, siempre positiva. Enhorabuena por este magnífico año. A Aroa, con una sonrisa siempre preparada.*

*A Begoña, Patri, Ana Belén, David, André, Elena (¡ya doctora!), Maru, Félix, Vero, Ignacio y Alberto porque todos me habéis enseñado algo.*

*Algunos estuvieron en mis comienzos. A Maribel, por ser mi “mamá pata” cuando entré aquí. Gracias por tu paciencia en mis inicios.*

*A Esther Civantos, por tus mañanas aceleradas y tu sinceridad aplastante, tu carácter arrollador y, sobre todo, por tu cariño. Tus pequeños siguen ocupando un lugar privilegiado en mi book infantil.*

*A Elena, por tu carácter, tu punto de vista un pelín extremo en ocasiones pero, sobre todo, por tu buen corazón. Espero que algún día vuelvas a entrar por la puerta con un libro en la mano.*

*A Rocío, nuestra madrileña con pinta de andaluza. Por tu carcajada eterna, tu positividad, por defender tus ideales siempre, por poner el amor delante de todo. Mucho ánimo y espero verte muy prontito.*

*A Marina, breve estancia con nosotras. Siempre recordaré tu dulzura y saber estar. Estoy segura de que todo te irá muy bien. Y a Rosa, poquito tiempo pero el suficiente para demostrarnos tu valía y buena cabeza.*

*Y cómo olvidarme de Carmen, nuestra BIR preferida. Gracias por enseñarme que se puede llegar si se quiere, por tu tesón, tu fuerza interior, tu capacidad para seguir adelante. Y porque tú fuiste la que iniciaste todo esto.*

*Otra Carmen, la más pequeña de todos los que han pasado por aquí. Callada pero muy inteligente. Con tus ojos lo decías todo. Seguro que con el tiempo, aunque Burgos no te guste, sabrás ver lo que has conseguido con tu empeño y sacrificio.*



*Y antes de llegar a los que están, los últimos en llegar, no olvidarme de Régula, nuestra auxiliar internacional. Tu vitalidad y tus ganas de disfrutar de la vida al máximo siempre los tendré como referente. Sin tu ayuda, esto tampoco habría podido funcionar. Y pasaste el relevo a Flor e Isabel, tan diferentes pero igual de queridas y apreciadas. Gracias por hacer que nuestro trabajo sea un poquito más fácil. A Carmen, “de algo hay que hablar”, por su buen corazón y hacerme compañía muchas tardes. Y por supuesto a Fernando, uno de los pocos que conoció a Don Carlos, siempre amable y simpático, por todos esos sándwiches gratis a ultimísima hora de la tarde y todos esos cafés tan bien puestos.*

*Y ahora les toca el turno a mis dos chicas preferidas, Cristina y Erica. Cristi, andaluza de cabo a rabo, con ese brío y esa vitalidad que hace que tu día sea mejor. No pierdas nunca tu espontaneidad, tu velocidad al hablar e, incluso, tu don de la oportunidad que tan buenos momentos nos ha brindado (y lo seguirá haciendo, estoy segura). Espero que esos ojazos verdes olivita sigan transmitiendo siempre el mismo optimismo, pase lo que pase. Y ánimo que las malas rachas pasen. Y Eri, japonesa por genética pero castiza hasta la médula. Un añito juntas trabajando pero como toda una vida. Responsable, con muchas ganas de aprender y siempre ahí, dispuesta a ayudar, sigue acumulando arruguitas en los ojos porque eso significa que has sido muy feliz. Dos soletes que trajeron mucha alegría y aires nuevos y que espero siempre me acompañen en los momentos importantes. Chicas, se os quiere (bueno, y al francesito y al de Leganés también).*

*Y también están “los nuevos” de al lado. A Miriam, la recaudadora y acumuladora oficial de prensa. Sincera y honesta, con un gran sentido del*

*humor. A José Manuel, nuestro chico, el andaluz más vallisoletano que he conocido, el hombre de las teorías imposibles y que todavía no me odia por mis apariciones tras el cristal (espero que nunca lo hagas). A Esther, pausada pero en el fondo un manojillo de nervios, entusiasta de las presentaciones de PowerPoint. No olvides que llegarás donde quieras llegar. Gracias a los tres por vuestro apoyo constante.*

*Por supuesto, una parte importante en esta historia ha sido el Servicio de Alergia. Agradecer al Dr. Joaquín Sastre, jefe del Servicio, todo su apoyo en este y otros trabajos que poco a poco van dando sus frutos. Al Dr. Santiago Quirce, ahora jefe del Servicio de Alergia de La Paz, su ayuda y apoyo incondicional. Gracias Santiago por brindarme la oportunidad de entrar en el mundo de la Alergología y considerarme válida para enseñar, al resto del mundo de este campo de la medicina, lo que hacíamos en La Concha. No una, sino en diversas ocasiones. Nunca podré olvidar lo que ha significado ese primer congreso de Alergia en Valencia en mi vida. A Mar, la tutora de residentes más peleona que he conocido. Luchadora nata, vitalista y emprendedora. Compañera de fatigas en esta historia del esputo inducido. Me alegra mucho ver que poco a poco vas encontrando el huequito que te mereces. Y, desde luego, enhorabuena por el “puesto” que dentro de poquito tendrás que empezar a desempeñar. Y ese es un cargo vitalicio, ¿eh? Al Dr. Manuel de las Heras por su simpatía y su ayuda con mi urticaria semicrónica y mi dermatografismo severo. Al Dr. Javier Cuesta, por su espíritu crítico y su sentido del humor, siempre presente. A la Dra. Elena Hernández, por su simpatía y buen talante. Nos conocimos en una rotación y ahora ya eres adjunta. A Nieves y Rosa, por ayudarme con toda aquella pila de historias que tuve que*

recolectar hace tiempo. A Marga y Adelaida, las mejores enfermeras que he conocido, por su buen humor y cariño. Ade, siempre tendremos algo compartido. A Julia, porque siempre me has intentado ayudar cuando lo he necesitado. Y a Manoli, esa voz impresionante que siempre intenta facilitar nuestro trabajo, hacer que las cosas vayan mejor.

En esta línea, recordar a todos los residentes que han pasado por aquí, principalmente a los últimos: Dani de Alcorcón, Paula de Toledo, pero sobre todo, a Ramón, el papá gallego más orgulloso y feliz de toda Valencia. Todavía recordamos tu pulpito. Espero que seas muy feliz con Patricia y tu pequeña María. Ojalá volvámos a encontrarnos. Y una mención especial para María de La Paz, nuestra Mari. Pues sí, después de tanta andadura, y de tanto preguntar “¿ande está mi marío?”, lo encontraste. Nos debes unas cañas y enseñarnos ese pedruscón. Que seas muy muy feliz. Y por supuesto, para la residente más especial que hemos tenido, la Dra. Olga Luengo, Miss Bradford o mi chica patinadora. Enhorabuena por esa preciosidad de niña que tienes, Gabriela. Gracias por ayudarme con todo, por tus consejos, tu forma de ver la vida, ese arranque tan magnífico que tienes, por esa positividad inagotable. Y felicidades por el número par que llega a tu familia.

Pero todos estos años hacen que pases muchas horas en el hospital y las relaciones sociales se amplían de forma exponencial con el tiempo.

A toda la gente del laboratorio del Dr. Egidio: Ana, Loli, Begoña, Roxana, Conchi, Virginia, Alberto, Álvaro, Rosario, Eva, Elsa, Alberto, Julio, Vanesa, Beñat, Lupe, Luis, José Luis, Sara, Belén, Irene (que se ha cambiado de ubicación) y alguno que seguro se me escapa.

*A la Dra. Carmen Gómez, Carmen, por su sencillez y buen humor. Siempre dispuesta a ayudarme cuando se lo he pedido.*

*A Julio, el chico del Principito. Por tu honestidad, tu buen hacer y porque estoy segura de que llegarás lejos.*

*A Juan, el primo. Por esa gracia andaluza que me ha hecho sacar una sonrisa aunque no fuera el mejor de mis días. Tu acento francés es el mejor.*

*A Bea, mi “chica Egido” preferida. Por tu talante y sinceridad, por ser compañera de penurias con el bendito citómetro. Por ser la original, sin dobleces. Gracias por los momentos de risas compartidos.*

*A Óscar, uno de los Osquichus. Compañero trasnochador. Por el tiempo dedicado a altas horas de la tarde para enseñarme a manejar animales o a altas horas de la madrugada a mil kilómetros de distancia; por las cenas en japoneses o asadores tradicionales, por todos esos regalos que tienes acumulados en tu casa y miles de horas de conversación gratificante. Por tu forma de ser tan especial, porque crees en unos principios y, sobre todo, porque eres fiel a ellos. Porque has sido un buen compañero pero, principalmente, eres y serás siempre un buen amigo. Gracias por esto y todo lo demás.*

*Y al otro Óscar. Porque tu capacidad de ser independiente desafía toda lógica. Sin duda alguna, eres el buscador de información más rápido que conozco.*

*Y qué decir de los chicos del desgraciadamente desaparecido Dr. Caramelo. A Juanjo, el gaditano menos andaluz de todos los que existen. Por ser un investigador constante y amante de su trabajo y una persona excepcional. Sé que ahora encontraste a la media naranja que siempre te habías merecido. A Fernando, Nando para los demás, ese atlético incondicional,*

*apasionado sin medida. En fin, Fernando. Y a Eva, por ser tu equilibrio. A Alai y Carmen, soletes los dos. A Silvia y Jorge, una pareja que ha defendido sus ideales lanzándose a la aventura para alcanzar su sueño. Estoy segura de que os va a ir muy bien. Siempre recordaré nuestro viaje a Granada, vuestra casa, vuestra hospitalidad y cariño. A Olalla, Ruth y Sergio, cada cual más diferente pero todos bellísimas personas. Gracias a todos por vuestro apoyo y ayuda.*

*No me puedo olvidar de los más jóvenes, los últimos que llegaron. Los chicos y chicas del Dr. Esbrit. A Juanan, por su carácter siempre tranquilo y educado. A Vero, por su sonrisa, su ayuda con la apoptosis y todo cuanto se necesitaba. Seguro que estáis muy bien allende los mares. A los más jóvenes, Dani y Luis. Que sepas, Dani, que eres el más guapo, fiu,fiu y mi mejor control. Y el sevillano más salado y despistado de Madrid. Gracias por aquella fiesta de inauguración de tu casa. A Sergio, que te vas haciendo con toda la chavalería. Y a Ana, que poco a poco vas haciéndote un huequito. A Pía, nuestra representante más eficiente y Bea, “Bea Lípidos”, que espero te esté yendo todo genial.*

*También agradecer a la Dra. Raquel Largo y, sobre todo, a su gente: Juan, Miriam y Lidia, por su ayuda con la prostaglandina y “familiares”.*

*Por último, Laura y Sandra, las chicas de Neumo y proveedoras del mejor chocolate negro a última hora de la tarde. Ánimo que todo termina saliendo.*

*A Curra, por su inestimable ayuda con el microscopio confocal, su espíritu guerrero y luchador. A las chicas del animalario, en especial a M<sup>a</sup> Luisa, porque mis comienzos fueron con ratones y tu ayuda incondicional nunca se olvidará. Ya te queda poquito para disfrutar de lo que te mereces. E incluso a Alejandro, técnico de BD, el ángel de la guarda del equipamiento máspreciado, por su vital ayuda.*

*Agradecer a la gente de Canadá que, aunque por poco tiempo, fueron mis compañeros y familia. Al Dr. Manel Jordana por su generosidad e inestimable ayuda, siempre accesible; Alba, que me acogiste como si nos conociéramos de siempre, Mari Pierre, la canadiense más latina, Iqbal, Salvador, Tina, Ramzi, Susanna, Dominik (mi compañero de salsa en Hamilton), Juan Carlos, Maria Leonor, Misses Dorothy y a todos aquellos que me hicieron sentir como en casa. De allí me traje una gran experiencia profesional pero, sobre todo, personal.*

*Y, evidentemente, dar las gracias a todos los pacientes de este estudio ya que sin su ayuda y colaboración este trabajo no existiría. Vosotros sois la motivación principal, el por y el para. A mis controles sanos: chicas de la escuela de enfermería, algún residente y, sobre todo, compañeros de investigación (incluida la directora de esta tesis) todos ya mencionados, que entendéis lo importante que es el apoyo de los compañeros para que algo salga adelante.*

*Evidentemente, mucho he de agradecer también a mi gente de siempre. A Marta, Nieves y Raquel, por estar ahí cuando algo iba mal, aguantando mis*

*chorreos y soliloquios insufribles. Por todos esos momentos buenos que hemos pasado juntas (noches en el Manaos, viaje a Salamanca,...) y, sobre todo, por todos los que nos quedan. Gracias chicas por soportarme y entenderme.*

*Y otros tantos amigos siempre pendientes de las evoluciones de esta historia: Carlos, con sus titas y pesca y su gran calidad humana. Ramiro, que aunque tu vida ha dado varias vueltas que en ocasiones te han dejado del revés, creo que por fin has encontrado tu camino. Roberto, el más internacional de todos, un muy buen amigo, inteligente y muy, muy especial en su forma de entender la vida.*

*A mis compis de la facultad: Montse con su sempiterna carcajada; Rubén, el inicio de biólogo que terminó en terapia ocupacional pero al que sigo considerando un biólogo en ciernes; Mónica, Moni, mi doctora en Biología preferida y que espero esté siendo muy feliz por esas tierras de Castilla, Jaime y Sara, el auténtico Eminem y la chica más dulce que he conocido. Gracias por estar siempre pendientes. Espero que pronto nos veamos.*

*Ya Fran, compi de piso político. Por esos momentos de ópera y una copa de vino, las conversaciones en el sofá, tu espontaneidad y tu cariño. Sólo tres años desde que nos conocemos pero ya te has hecho un huequito. Te haces querer, malagueño.*

*Por último, pero no por ello menos importante, mi familia. Este trabajo está dedicado a mis padres. Sin su esfuerzo para darme lo mejor esto no habría sido posible. Gracias por estar ahí, siempre apoyándome. Sé que el camino laboral que elegí no es el convencional, no te da una estabilidad ni grandes ingresos, pero era lo que yo quería. Y siempre lo habéis apoyado. Gracias por enseñarme de la vida prácticamente todo lo que sé, por darme unos firmes*

*valores de honestidad y honradez, por animarme a superarme a mí misma, intentando ser un poquito mejor cada día. Espero que os podáis sentir tan orgullosos de esto como lo estoy yo por tener los mejores padres que uno puede desear tener.*

*A mi hermana mayor, Ruth. Modelo de constancia, tesón y trabajo. Y, por fin, tienes tu recompensa merecida. Pero sobre todo por ser mi hermana. Gracias por tus consejos, siempre buenos. Por todos esos momentos vividos juntas, esas risas y enfados. Al final, todo se guarda en la memoria como buenos recuerdos. Y a Alberto, mi cuñado pero como si fuera mi hermano. Por tu espontaneidad y sentido del humor, por tu ayuda siempre que la he necesitado y por hacer feliz a una de las personas que más quiero.*

*Y a mi hermana la pequeña, Chesi. Bueno, que de pequeña ya poco. Toda una señora arquitecta en breve. Por ser como tú eres, saliendo de los estereotipos, por disfrutar de la vida de la forma que más te gusta. Por estar ahí, aguantando los chorreos por mi culpa. Y por ser mi hermana pequeña pero de la que siempre sigo aprendiendo algo.*

*A mi abueli Socorro. Siempre me has apoyado en todo lo que he hecho y has conseguido, viendo lo orgullosa que estabas de mí, que yo también lo estuviera. Estoy segura de que todavía quedan muchos momentos en los que puedas sentirte así y espero que éste sea uno de ellos.*

*A mis abuelitos Gonzalo, Demetria y Ramón, éste último al que no pude conocer. Por todo lo que me enseñasteis o queríais haberme enseñado. A todos mis tíos y primos, porque siempre han estado apoyándome. La mejor familia que uno puede tener.*



*Ya Luis. Comienzos algo indecisos pero el tiempo ha confirmado todo lo que yo ya sabía hace más de tres años. Gracias por entenderme y ayudarme en mis momentos de ofuscación, por enseñarme tantas y tantas cosas con paciencia, por involucrarte con mi trabajo y hacerme sentir orgullosa de él, por apoyarme en todo momento pero siempre aportando un punto crítico de gran valía. Pero sobre todo por ser una persona buena y honrada, justa y tranquila, aportando ese equilibrio que tanto necesitaba cuando te conocí y estando a mi lado en todo momento. Por aceptar mis defectos y errores, por aportar luz y calor en los días fríos y oscuros. Eres una parte importante en mi futuro. Ya sabes, regular importante en mi vida.*

*Pensaréis que tal vez he sido exagerada en este capítulo, que me he extendido demasiado. Pero no miento si afirmo que, aunque es el último apartado de esta tesis, como dice el refrán “es de bien nacido ser agradecido”, y todas las personas que aquí aparecen (e incluso las que hayan podido quedar olvidadas) merecían este tiempo y espacio. Gracias a todos.*